Editora Poisson

INTRODUÇÃO À PROSPECÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

Selene Maia de Morais
Ícaro Gusmão Pinto Vieira

Mandacaru quando fulora na seca é o sinal que a chuva chega no sertão...!

Selene Maia de Morais
Ícaro Gusmão Pinto Vieira

Introdução à Prospecção de Produtos Naturais

1ª Edição

Belo Horizonte

Poisson

2021

Editor Chefe: Dr. Darly Fernando Andrade

Conselho Editorial

Dr. Antônio Artur de Souza – Universidade Federal de Minas Gerais
Ms. Davilson Eduardo Andrade
Dra. Elizângela de Jesus Oliveira – Universidade Federal do Amazonas
Msc. Fabiane dos Santos
Dr. José Eduardo Ferreira Lopes – Universidade Federal de Uberlândia
Dr. Otaviano Francisco Neves – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
Dr. Luiz Cláudio de Lima – Universidade FUMEC
Dr. Nelson Ferreira Filho – Faculdades Kennedy
Ms. Valdiney Alves de Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia

Capa

Figura do Mandacaru (Cereus jamacaru DC), planta nativa da Caatinga.

A frase foi retirada da música de Luiz Gonzaga "Xote das meninas"

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

I61

Introdução à Prospecção de Produtos Naturais/ MORAIS, Selene Maia de VIEIRA, Ícaro Gusmão Pinto – Belo Horizonte– MG: Poisson,2021

Formato: PDF
ISBN: 978-65-5866-110-8
DOI: 10.36229/978-65-5866-110-8

Modo de acesso: World Wide Web
Inclui bibliografia

1.Bioquímica 2.Biotecnologia I. MORAIS, Selene Maia de II. VIEIRA, Ícaro Gusmão Pinto. III.Título

CDD-660

Sônia Márcia Soares de Moura – CRB 6/1896

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos seus respectivos autores

www.poisson.com.br

contato@poisson.com.br

Autores

Selene Maia de Morais

Possui graduação em Química Industrial e mestrado em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará e doutorado em Química - University of London. Fez estágio de Pós-Doutoramento na Universidade de Aveiro em Portugal. Foi professora da Universidade Federal do Ceará, na graduação e Pós-graduação, exercendo os cargos de Coordenadora do Curso de Química e Diretora do Laboratório de Produtos Naturais. Atualmente é Professora Titular da Universidade Estadual do Ceará (UECE) e bolsista de produtividade do CNPq. Foi coordenadora do Curso de Química da UECE, participou do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e atualmente orienta alunos dos Cursos de Doutorado em Biotecnologia da RENORBIO, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) e em Ciências Naturais (PPGCN). Foi Coordenadora do PPGCN e do Doutorado em Biotecnologia da UECE. Participou da Câmara de Pesquisa da FUNCAP, sendo consultora Ad-hoc da FAPEMA, da FAPEPI e do CEUB. Coordenadora do Laboratório de Análises Cromatográficas e espectroscópicas (LACES) da UECE. Tem experiência na área de Química dos Produtos Naturais, atuando principalmente na obtenção e caracterização estrutural de compostos orgânicos fixos e voláteis, síntese de derivados e avaliação de suas propriedades biológicas como antioxidante, anticolinesterásica, larvicida contra Aedes spp. dentre outras.

Ícaro Gusmão Pinto Vieira

Possui mestrado em Química Orgânica - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (1990) e Doutorado em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará (2003). Tem experiência na área de Química, com ênfase em Química dos Produtos Naturais, atuando principalmente nos seguintes temas: química fina, sínteses Orgânicas, CLAE, Química de Produtos Naturais, Desenvolvimento de produtos e processos e métodos para controle de qualidade. Atualmente é Professor Visitante do Programa de Pós- Graduação em Recursos Naturais da UECE. Desenvolve atividades de Pesquisa no Laboratórios de Bioquímica Humana do Curso de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde - CCS como Pesquisador Colaborador e no Laboratório de Química de Produtos Naturais do Curso de Química da UECE e de Pesquisa e Desenvolvimento no PADETEC e é Professor colaborador do Mestrado Acadêmico em Nutrição e Saúde da UECE.

Prefácio

A prospecção de produtos naturais de plantas se faz através de metodologias que estão inseridas na linha de estudo denominada fitoquímica, essencial para o seu aproveitamento.

A investigação de substâncias presentes em plantas e outros organismos vivos exige o desenvolvimento de procedimentos padronizados para a preparação de extratos de forma reprodutível e eficiente e a determinação da sua composição química. As principais técnicas envolvidas nesta investigação constituem as metodologias como cromatografia em fase gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em camada delgada (CCD) e técnicas de fracionamento de extratos de composição complexa.

Este livro está dividido em sete capítulos em que será feita a apresentação dos diversos tipos de metabólitos secundários presentes em plantas, preparação de extratos das várias partes das plantas por diversas metodologias, isolamento e caracterização destes constituintes por métodos cromatográficos de análise, testes fitoquímicos, utilizando reagentes específicos com formação de precipitados ou mudança de coloração para a caracterização das principais classes de compostos e testes espectrofotométricos para prospecção de compostos fenólicos e determinação de suas atividades antioxidantes.

Os vários métodos de extração e de cromatografia permitem o desenvolvimento do estudo de extratos de plantas, resultando o acesso a substâncias importantes como os compostos denominados de flavonoídes, alcaloides, acetogeninas, terpenoides, taninos, polissacarídeos, lipídeos, dentre outros.

Este livro foi elaborado inicialmente para consulta na disciplina de Química de Produtos Naturais ministrada no Curso de Química, bem como nas disciplinas de Prospecção de Recursos Naturais do Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais e da disciplina Processos de Extração, Purificação e Quantificação de Produtos Naturais do Doutorado em Biotecnologia da RENORBIO da Universidade Estadual do Ceará.

Sumário

Capítulo 1: Principais classes de produtos naturais do metabolismo secundário das plantas..... 07

Capítulo 2: Processos de extração de produtos naturais 40

Capítulo 3: Métodos de purificação de produtos naturais..... 61

Capítulo 4: Testes fitoquímicos de caracterização e de separação de metabólitos secundários - cromatografia 67

Capítulo 5: Preparação de derivados (metilação, acetilação e hidrólise) 79

Capítulo 6: Quantificação de produtos naturais (fenóis totais, taninos, flavonóides, etc) por cromatografia em camada delgada / cromatografia liquida de alta eficiência 84

Capítulo 7: Testes de atividade antioxidante e quantificação de fenóis e flavonóides de extratos e constituintes de plantas 91

Capítulo 8: Algumas técnicas de análise estrutural de extratos de produtos naturais..... 104

Referências bibliográficas..... 114

01 Principais classes de produtos naturais do metabolismo secundário das plantas

INTRODUÇÃO

Os constituintes químicos encontrados nos vegetais são sintetizados e degradados por inúmeras reações que constituem o metabolismo das plantas. A síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais, tais como: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados fazem parte do metabolismo primário das plantas. Enquanto que os compostos sintetizados por outras vias e que aparentam não ter grande utilidade na sobrevivência das espécies, fazem parte do metabolismo secundário, logo são denominados de metabólitos secundários.

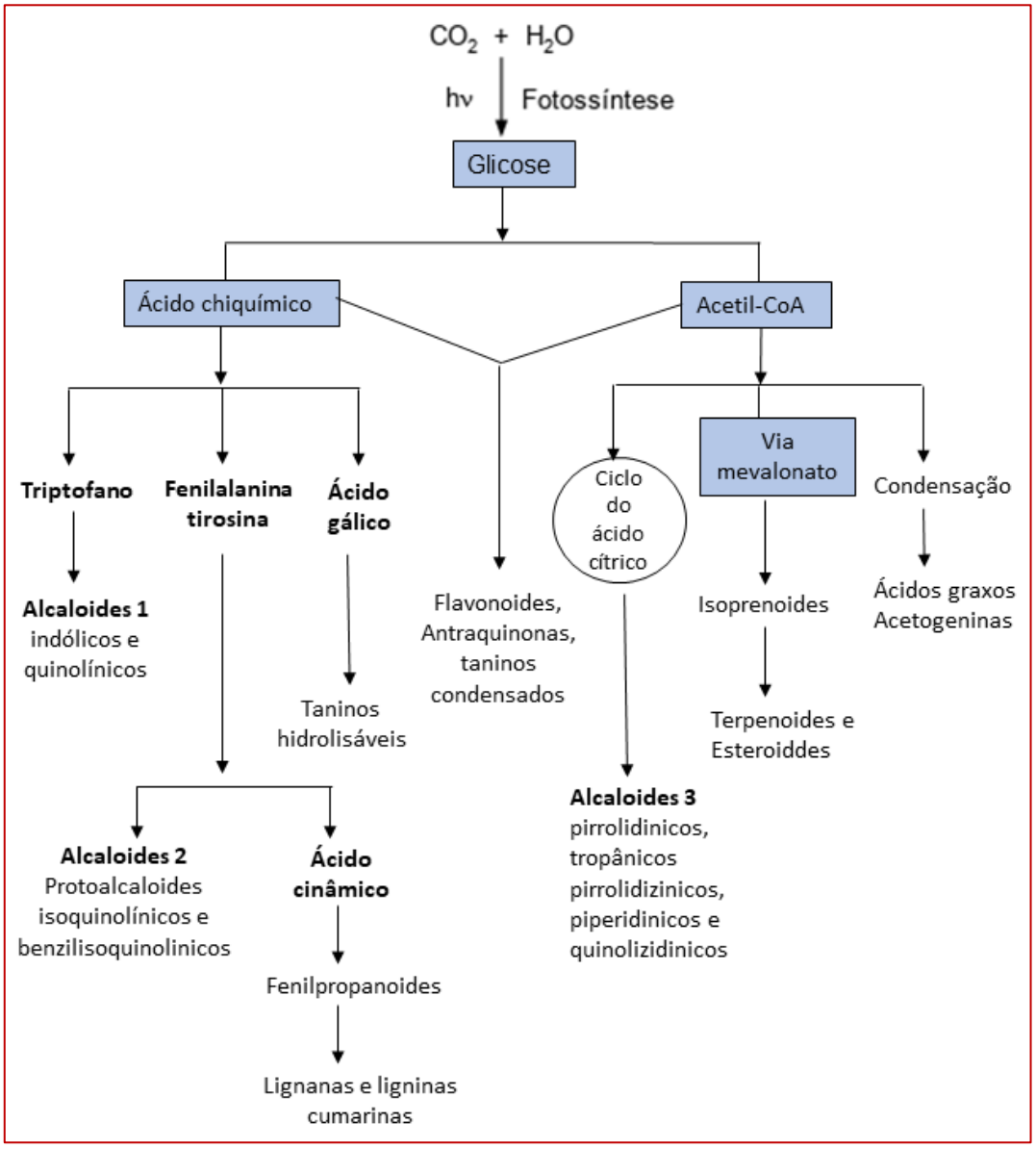
Os metabólitos secundários são originados do metabolismo dos carboidratos que são formados no processo de fotossíntese. Na biossíntese dos metabólitos secundários, os carboidratos são degradados através da glicólise gerando ácido pirúvico que por descarboxilação oxidativa forma o acetil-CoA (acetato) e através do ciclo das pentoses gera-se o ácido chiquímico (SOUZA, 2010). O ácido chiquímico e acetil-CoA são os principais precursores biossintéticos dos produtos naturais do metabolismo secundário (Figura 1).

No primeiro capítulo será feita uma apresentação concisa dos diversos tipos de metabólitos secundários presentes em plantas, agrupados segundo a sua origem biossintética, dando informações de suas ações farmacológicas, usos populares e alguns tipos de análises.

Pequena lista de produtos úteis obtidos de plantas:

Alimentos e bebidas, Especiarias, Corantes e pigmentos, Cosméticos e perfumes, Óleos industriais, ceras, gomas e resinas, Taninos, Saponinas, Borracha e Fibras Naturais, Madeira, Inseticidas e herbicidas, Plantas Medicinais, Medicamentos, Especialidades Químicas.

Figura 1. Principais rotas metabólicas para a biossíntese de metabólitos secundários.



1.1 TIPOS DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM PLANTAS

Os metabólitos secundários serão divididos em três grupos:

1. Compostos sintetizados a partir do ácido chiquímico

2. Compostos derivados da condensação do ácido chiquímico (cinâmicos) e da acetil-CoA (malonilCoA)

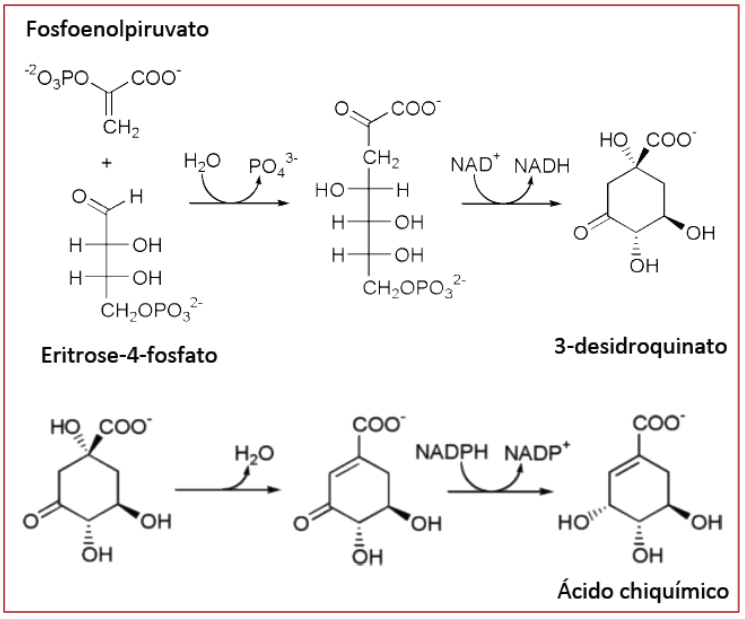
3. Compostos derivados da acetil-CoA

1.1.1. COMPOSTOS DERIVADOS DO ÁCIDO CHIQUÍMICO

A biossíntese do ácido chiquímico está mostrada na Figura 2. Este ácido dá origem aos aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos como:

- Fenilpropanóides - propenilbenzenos, lignanas e cumarinas,
- Alcalóides aromáticos - indólicos, quinolínicos, protoalcalóides, benzilquinolínicos e isoquinolínicos,
- Taninos hidrolisáveis

Figura 2. Biossíntese do ácido chiquímico

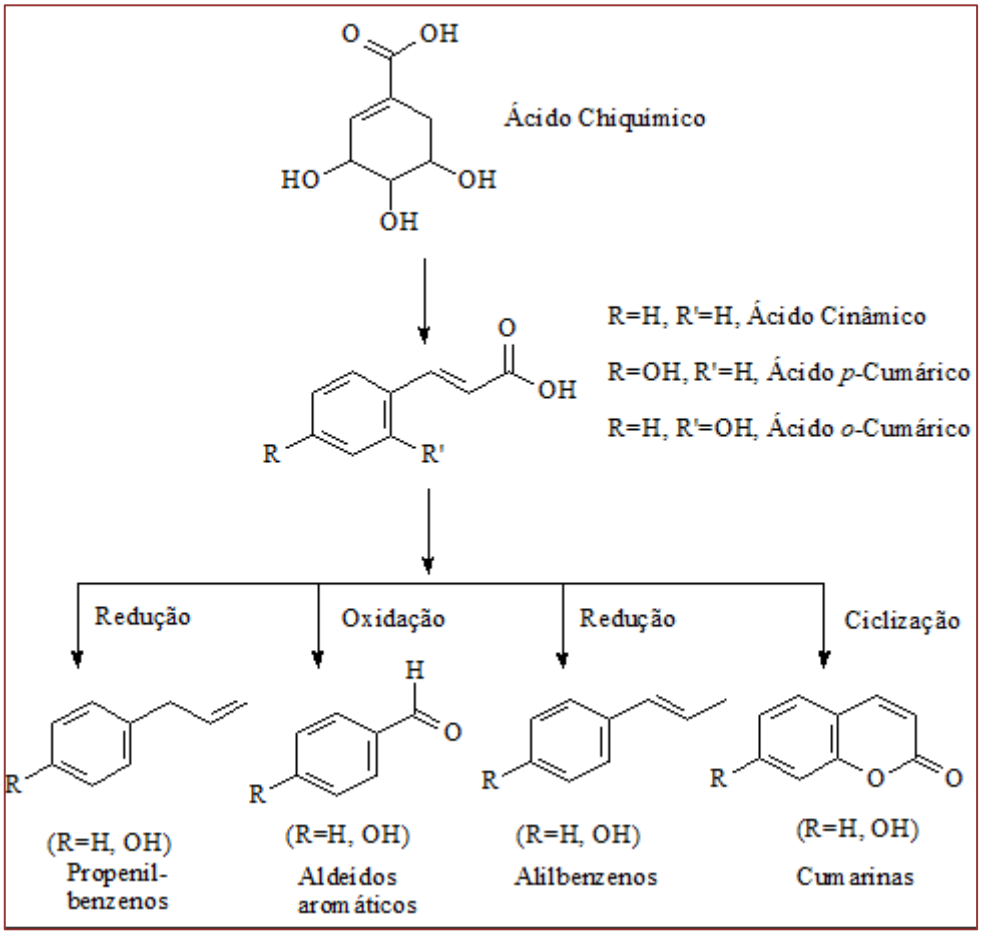


1.1 FENILPROPANÓIDES - PROPENILBENZENOS, LIGNANAS E CUMARINAS

1.1.1 FENILPROPANOIDES

Os fenilpropanóides são compostos formados a partir do ácido chiquímico, passando por intermediários como os ácidos cinâmico e cumárico através de reações de redução, oxidação e ciclização mostrados na Figura 3 (SIMÕES *et al.*, 1999). Dentre estes citam-se os alil- e propenil-benzenos, aldeídos aromáticos e cumarinas.

Figura 3. Representação estrutural de Fenilpropanóides de plantas.



1.1.2 PROPENIL- E ALILBENZENOS

A figura 4 mostra exemplos de fenilpropanóides comuns em óleos essenciais. *Croton zehntneri*, uma planta da caatinga e usada popularmente para problemas gástricos apresenta como principais constituintes do seu óleo essencial anetol (*p*-metoxi-propenilbenzeno) e estragol (*p*-metoxi-alilbenzeno). A planta quando foi coletada em 5 horários diferentes (5:00, 9:00, 13:00, 18:00 e 21:00 hs), apresentou uma variação no percentual destes constituintes, como está visto na figura 5. Portanto sugere-se uma interconversão entre esses compostos que são isômeros, como uma proteção às condições ambientais. Variações circadianas já foram observadas em outras plantas como o *Ocimum gratissimum* (alfavaca cravo) cujo óleo essencial apresenta o constituinte eugenol que varia ao longo do dia, com concentração máxima ao meio dia (SILVA *et al*., 1999).

Dillapiol é o principal constituinte do óleo essencial de *Piper permucronatum* que apresentou significante atividade contra as larvas de *Aedes aegypti* (MORAIS et al.,

2007). *Piper callosum* usada popularmente como adstringente, digestiva, anti-dirrêica, anti-blenorrágica e anti-leucorréica, apresenta como componente principal o safrol (MAIA; ZOGBI; ANDRADE, 2001).

Figura 4. Exemplos de fenilpropanóides comuns em óleos essenciais

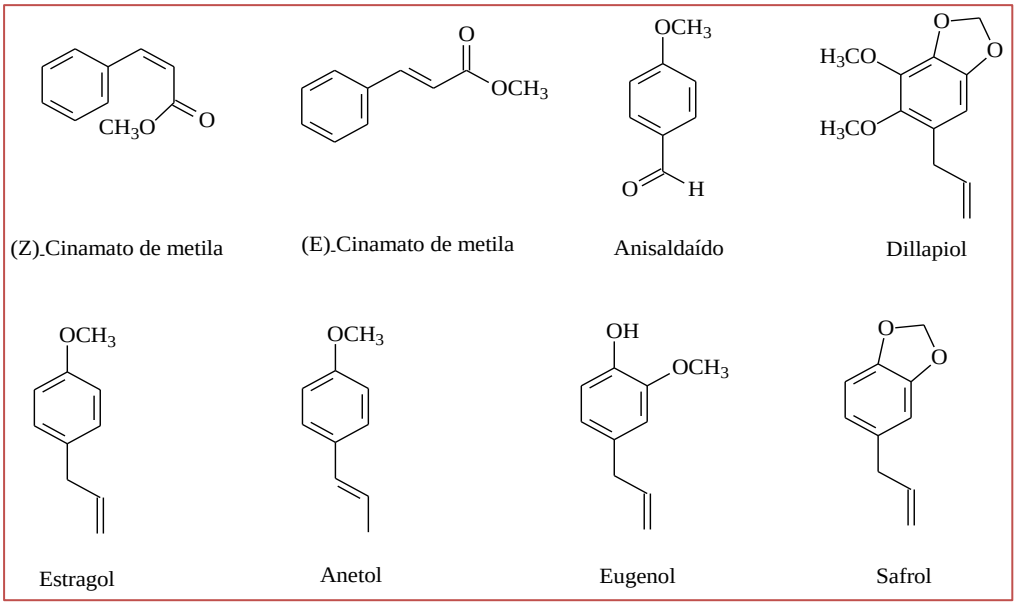
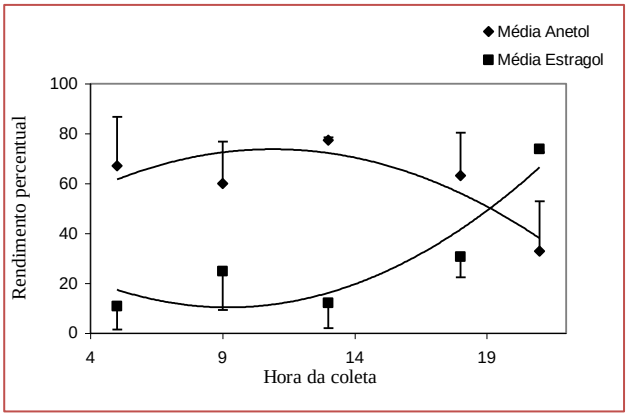


Figura 5. Variação do percentual dos constituintes principais dos óleos essenciais das folhas do *Croton zehntneri* coletadas em diferentes horários.



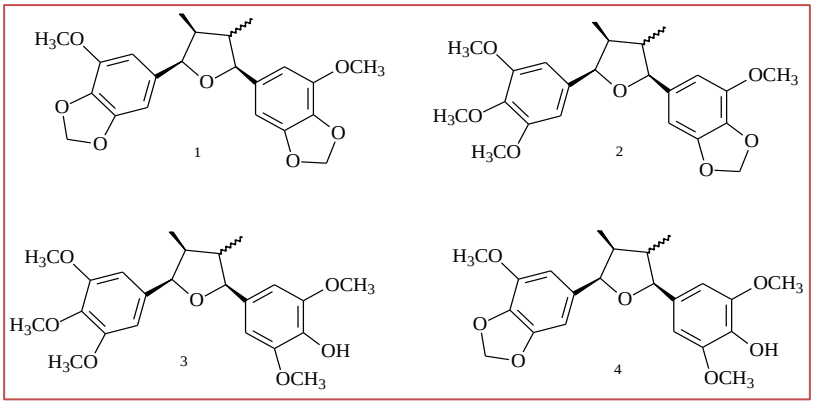
1.1.3 LIGNANAS E NEO-LIGNANAS

As lignanas e neolignanas são resinas fenólicas naturais e constituídas estruturalmente por dímeros de unidades C6-C3 (fenilpropanos). As lignanas são formadas principalmente do acoplamento dos ácidos e/ou álcoois cinâmicos ligados na posição β, que apresentam o carbono γ oxigenado. Como exemplo a sesamina (figura 6) isolada do

óleo de sésamo ou óleo de gergelim como também é conhecido, sendo muito utilizado para fins cosméticos, farmacêuticos, em perfumes, massagens e aromaterapias.

As neolignanas são dímeros de alil- e propenil-fenóis que apresentam o carbono γ não oxigenado. Como exemplo as neolignanas (1-4) isoladas de *Peperômia blanda* que contém um núcleo tetraidrofurano dotadas de atividade tripanocida (GASPARETO et *al.*, 2005). Veja as estruturas na Figura 6.

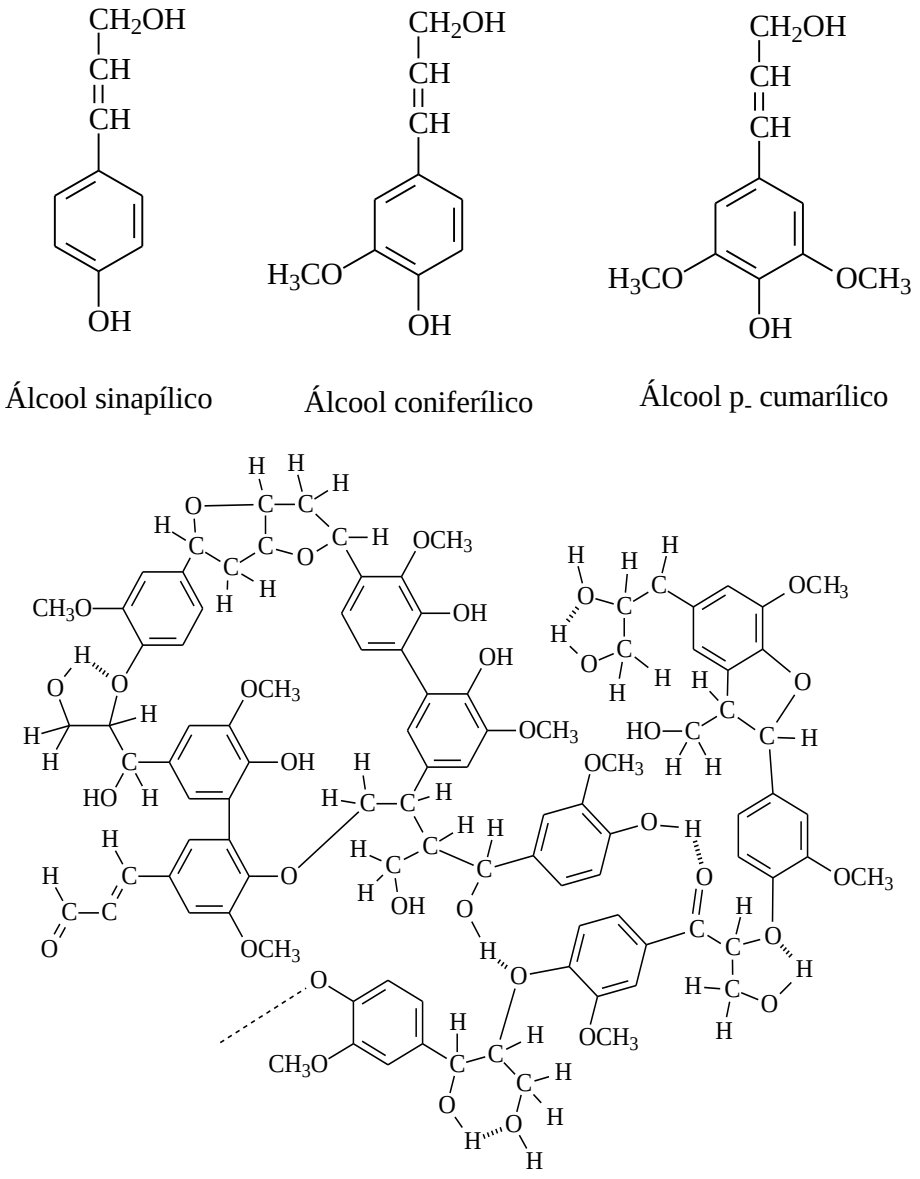
Figura 6. Representação estrutural Neolignanas



A lignina é um polímero de fenilpropanos encontrado nas plantas terrestres, associado à parede celular, cuja função é de conferir rigidez, impermeabilidade e resistência a ataques microbiológicos e mecânicos aos tecidos vegetais. A lignina é formada pela polimerização dos álcoois cumarilíco, coniferílico e sinapílico. A proporção destes três compostos resulta em diferentes tipos de lignina (Figura 7).

Na nutrição humana, as ligninas são consideradas fibras dietéticas indigeríveis. Estão presentes nas partes mais endurecidas de alguns alimentos vegetais tais como cenouras, brócolos, sementes e frutas tais como o morango.

Figura 7. Representação estrutural da molécula da lignina e compostos derivados.



1.1.4 CUMARINAS

As cumarinas são lactonas do ácido orto-hidroxi-cinâmico (figura 8). A prenilação do anel benzênico nas posições 6 e 8 do derivado 7-hidroxi-cumarina é o passo inicial na biossíntese de furano e pirano-cumarinas.

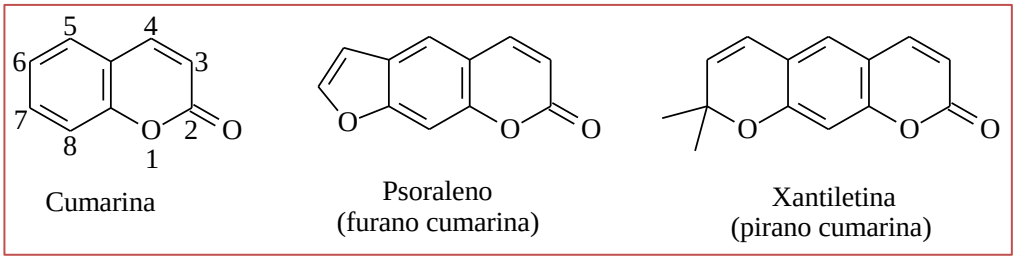
A literatura etnobotânica registra o emprego das raízes, cascas e folhas da planta denominada Inharé (*Brosimum gaudichaudii* Trec.) na forma de extrato caseiro topicamente no tratamento de vitiligo e outros tipos de manchas de pele. O psoraleno, uma furano-cumarina, confere à planta forte atividade fotossensibilizante, isto é, torna a

pele muito sensível à radiação solar e pode causar queimaduras. No entanto a exposição ao sol durante pequenos períodos pode ser usada para o tratamento de vitiligo (LORENZI e MATOS, 2002).

Formigas cortadoras de folhas são consideradas pragas para a agricultura devido à grande quantidade de material vegetal utilizado por elas para cultivar um fungo simbionte que lhes serve de alimento e enzimas. O mutualismo entre o fungo e as formigas é um ponto a ser explorado quando se considera sua possível aplicação em métodos alternativos para o controle desses insetos. Sabendo-se que algumas plantas são naturalmente resistentes aos insetos fitófagos, alguns produtos naturais foram avaliados em relação às suas propriedades inseticidas e/ou fungicidas. Foram isoladas oito cumarinas de quatro espécies de plantas e a xantiletina (pirano-cumarina) apresentou maior atividade contra o fungo simbionte (GODOY *et al.*, 2005).

No nordeste três plantas são usadas em separado ou em combinação na preparação de xaropes para gripe, devido suas propriedades broncodilatadora, analgésica e antiinflamatória – O guaco (*Mikania glomerata* Sprengel), cumaru-do-nordeste (*Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith) e o chambá também chamado de anador (*Justicia pectoralis* var. *stenophylla* Leonard). As três plantas apresentam como principal constituinte ativo a cumarina (LORENZI e MATOS, 2002).

Figura 8. Representação estrutural de cumarinas



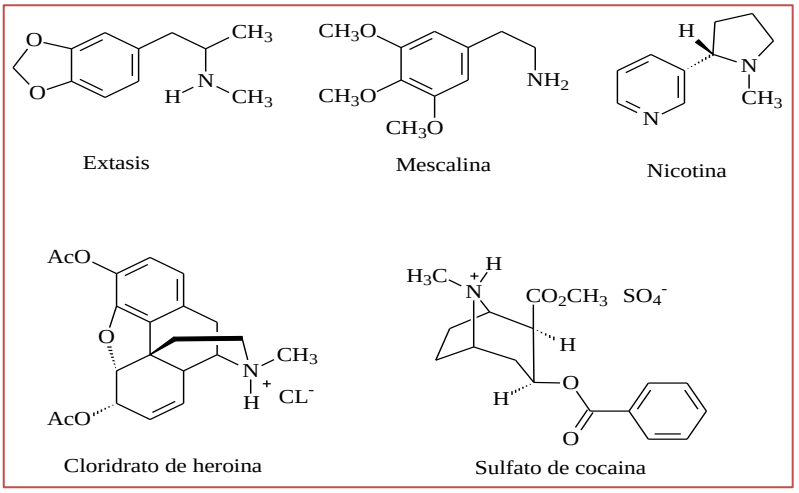
Cumarina | Psoraleno (furano cumarina) | Xantiletina (pirano cumarina)

1.2 ALCALÓIDES

Os alcalóides são compostos contendo nitrogênio de natureza básica, capazes de produzir geralmente poderosos efeitos fisiológicos. Um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes, tipicamente como aminas primárias, secundárias ou terciárias conferindo o caráter básico ao alcalóide e facilitando o seu isolamento e purificação desde que podem formar sais solúveis em água na presença de ácidos minerais.

O nome alcalóide deriva de álcali mas o grau de basicidade varia bastante, dependendo da estrutura da molécula do alcalóide, sendo muitos deles de natureza neutra. Os ácidos nucléicos e as proteínas, largamente distribuídos no reino vegetal, não estão incluídos nesta classe de compostos. Alcalóides contendo grupo amina quaternário também são encontrados na natureza. Alguns exemplos de alcalóides, com diferentes graus de substituição no nitrogênio estão mostradas na Figura 9.

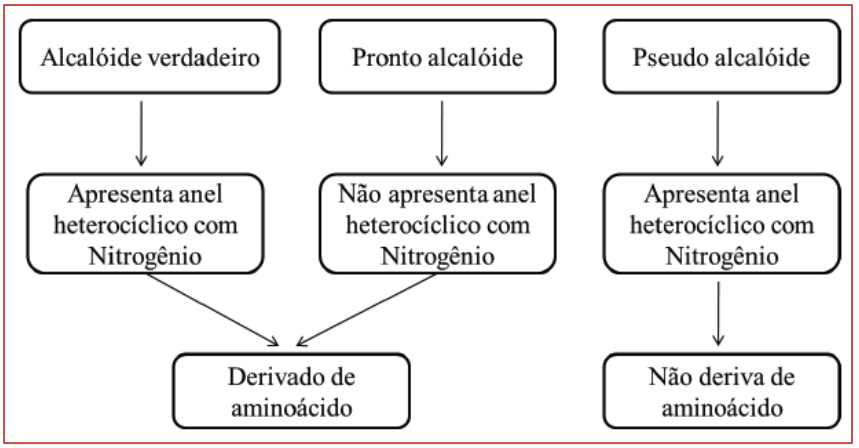
Figura 9. Exemplos de alcalóides com diferentes graus de substituição no nitrogênio.



Dois parâmetros são bem característicos dos diversos tipos de alcalóides:

- Atividade biológica (estimulantes, alucinógenos, venenos e farmacêuticos)
- Estrutura química – conforme a origem biossintética há três tipos de alcalóides: verdadeiro, proto-alcalóide e pseudo-alcalóide, descritos na figura 10.

Figura 10. Tipos de alcaloides conforme a origem

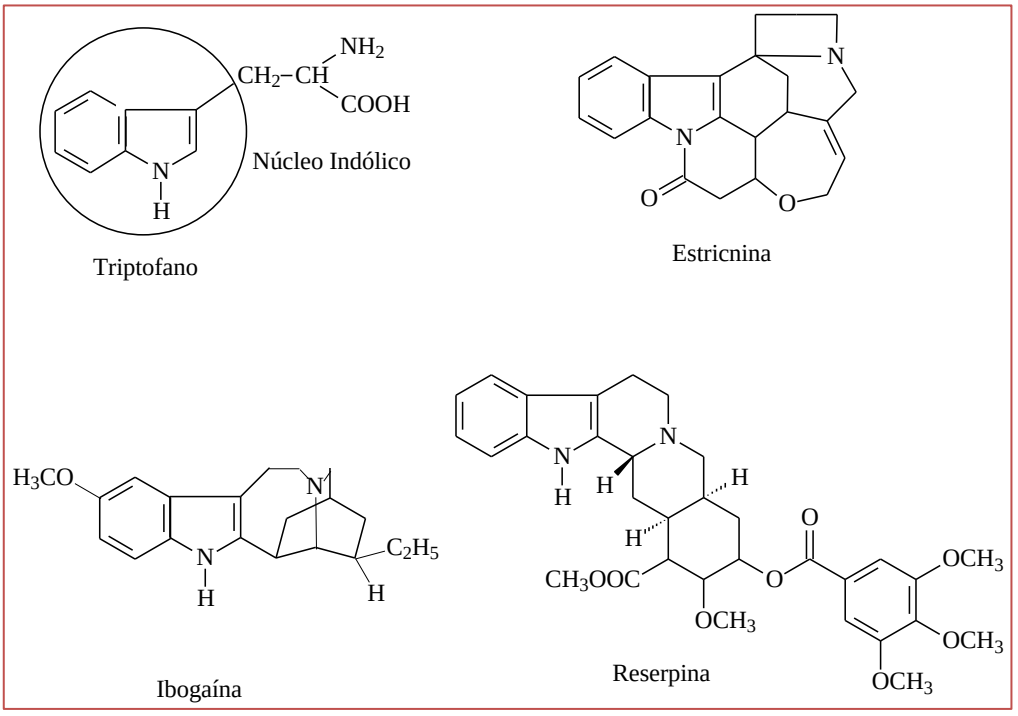


ALCALÓIDES VERDADEIROS AROMÁTICOS

As unidades precursoras dos alcalóides verdadeiros são aminoácidos. Os anéis que não apresentam nitrogênio ou cadeias laterais são derivadas de unidades terpênicas e/ou acetato, enquanto a metionina é responsável pela adição de grupos metilas aos átomos de nitrogênio.

Alcalóides aromáticos derivam principalmente do triptofano e da fenilalanina/tirosina. Os alcalóides derivados do aminoácido triptofano são denominados de alcalóides indólicos. Na figura 11 alguns exemplos de alcalóides indólicos como a estrictina (um poderoso veneno), a ibogaína (um estimulante) e a reserpina (um tranqüilizante).

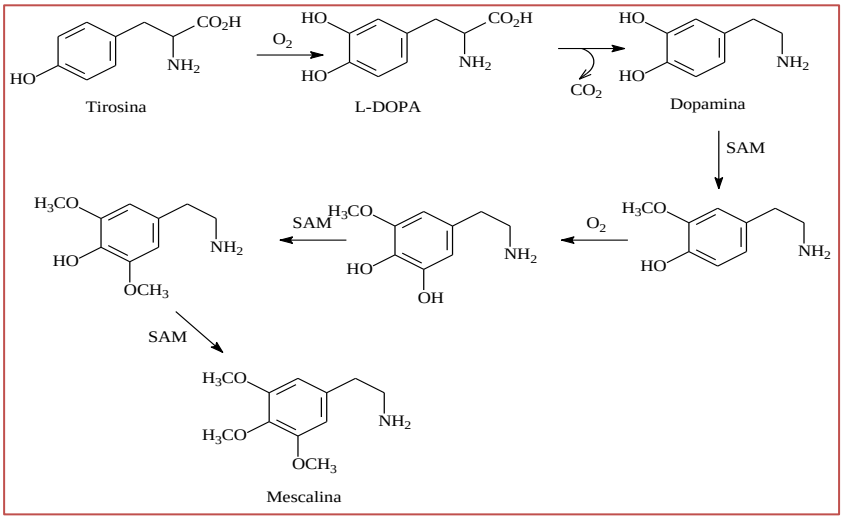
Figura 11. Estruturas de alcaloides



PROTO-ALCALÓIDES

Outro exemplo de alcalóide aromático, considerado protoalcalóide é a mescalina. A oxidação do aminoácido tirosina forma L-DOPA que sofre descarboxilação gerando a dopamina. Este último após metilação com a S-adenosilmetionona (SAM), oxidação e novas metilações com SAM forma a mescalina. Este alcalóide é um dos principais constituintes responsáveis pelas alucinações causadas pela planta *Lophophora williamsii* (Cacataceaea) utilizada pelos astecas nas cerimônias religiosas (DEWICK, 2004). A sua biossíntese está representada na figura 12.

Figura 12. Esquema reacional da biossíntese da mescalina

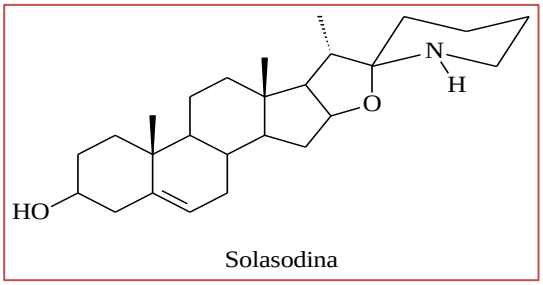


PSEUDO-ALCALÓIDES

Os alcalóides denominados de pseudo-alcaloides podem ser derivados de:

- Terpenóides e esteróides que sofreram reações de aminação através de mecanismos de oxido-redução, substituição, adição à ligação dupla ou transaminação enzimática, incorporando um nitrogênio de um aminoácido. Como exemplo a solasodina (Figura 13), encontrada nas plantas na forma de glicosídeos que é utilizada comercialmente para a síntese de hormônios esteroidais.

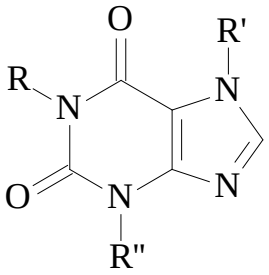
Figura 13. Representação estrutural da solasodina, um pseudo-alacaloide



Purinas – Como exemplo a cafeína extraída do café (*Coffea arábica*) e de outras plantas como o mate, guaraná e em menor percentual nos frutos do cacau. Cafeína pertence à família dos compostos que ocorrem naturalmente denominados de xantinas. Algumas xantinas são os mais antigos estimulantes do sistema nervoso central (SNC) e músculos esqueléticos. O estímulo aumenta a precaução, a insônia e a capacidade de pensar

(BETTELHEIM; LANDESBERG, 1995). Bases purinas denominadas xantinas que são encontradas nos alimentos estão representadas na figura 14

Figura 14. Representação estrutural das xantinas



XANTINAS

Xantina R = R' = R" = H
Cafeína R = R' = R" = CH_3
Teofilina R = R' = CH_3, R' = H
Teobromina R = H, R' = R" = CH_3

RESUMO DOS TIPOS DE ALCALÓIDES BASEADO NA VIA BIOSSÍNTÉTICA:

Alcalóides aromáticos são derivados dos seguintes aminoácidos aromáticos:

- Triptofano: alcalóides indólicos e quinolínicos
- Fenilalanina/tirosina: protoalcaloides, alcalóides isoquinolínicos e benzilisoquinilínicos

Alcalóides alifáticos derivam principalmente dos seguintes aminoácidos alifáticos:

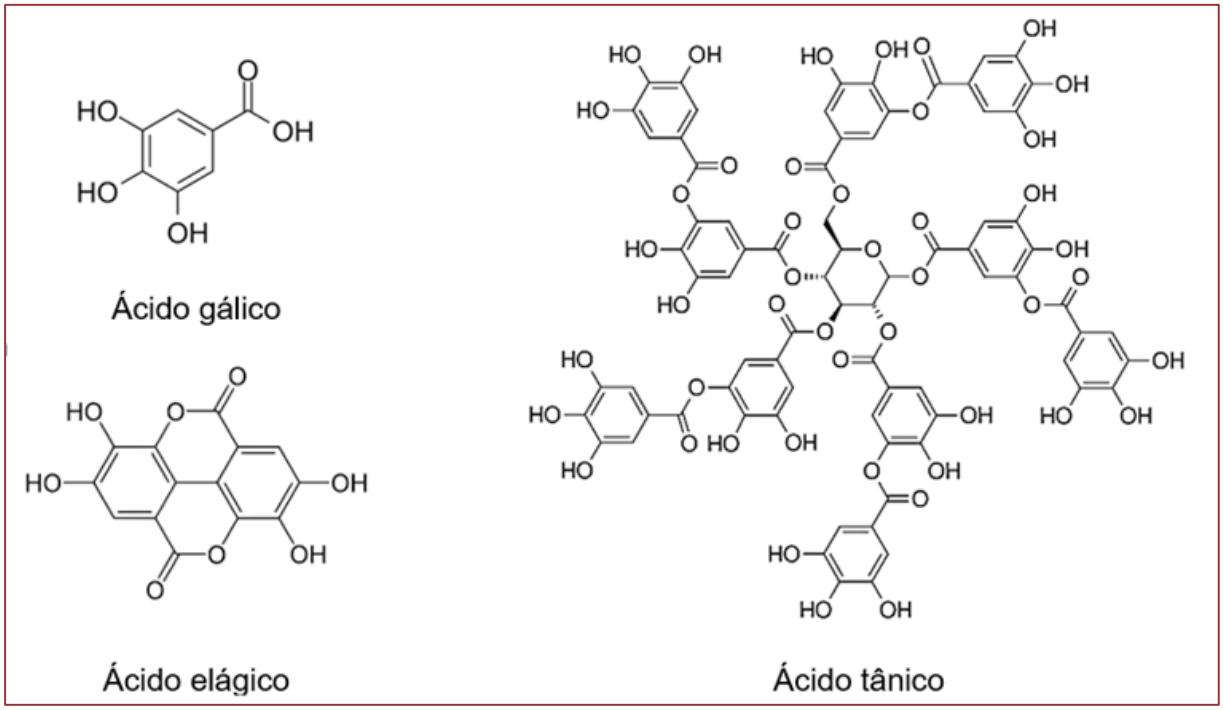
- Ornitina: pirrolidínicos, tropânicos e pirrolizidínicos
- Lisina: quinolizidínicos
- Abaixo há vários grupos de alcalóides e suas fontes naturais:
- Indólicos: estrictina, reserpina e ergometrina, ergotamina, ergotoxina da cravagem dos cereais;
- Alcalóides quinolínicos: caule folhoso da arruda comum
- Fenilalaninas/tirosina: capsaicina da pimenta, papaverina, mescalina;
- Alcalóides isoquinolínicos: morfina, etilmorfina, codeína e papaverina contidas no ópio da dormideira;
- Alcalóides piridínicos e piperidínicos: ricinina do rícino, trigonelina o feno-grego, coniina (veneno violento) da cicuta;
- Alcalóides esteróides: raiz do veratro (veratrina e protoveratrina A e B), doce-amarga (glicoalcalóides esteróides dulcina e dulcamarina), acônito (aconitina).

- Alcalóides derivados das purinas: cafeína
- Alcalóides derivados do tropano: escopolamina e atropina de beladona;

1.3. TANINOS HIDROLIZÁVEIS

Os taninos hidrolizáveis formam por hidrólise ácido tânico, ácido elágico, ácido gálico e glicose. O ácido elágico, encontrado principalmente na uva, morango e nozes, tem se mostrado efetivo na prevenção do desenvolvimento do câncer induzido pelas substâncias do cigarro (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A outra classe de taninos que são denominados catéquicos, não são hidrolizáveis e sua via biossíntética é a partir da condensação do ácido chiquímico com acetil-CoA (item 2.2.). A figura 15 mostra as estruturas de taninos encontrados nos alimentos.

Figura 15. Representação estrutural de taninos hidrolisáveis presentes em alimentos e o monômero ácido gálico.



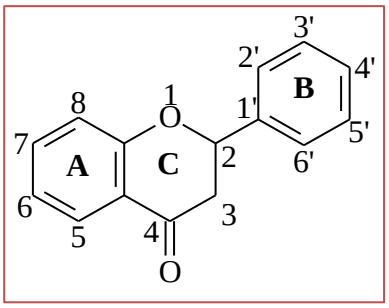
1.4. COMPOSTOS DERIVADOS DA CONDENSAÇÃO DO ÁCIDO CHIQUÍMICO E DA ACETIL-COA – FLAVONÓIDES, E TANINOS CONDENSADOS

1.4.1 FLAVONÓIDES

Flavonóides são compostos formados pela condensação dos ácidos cinâmicos com 3 unidades de malonil-CoA.

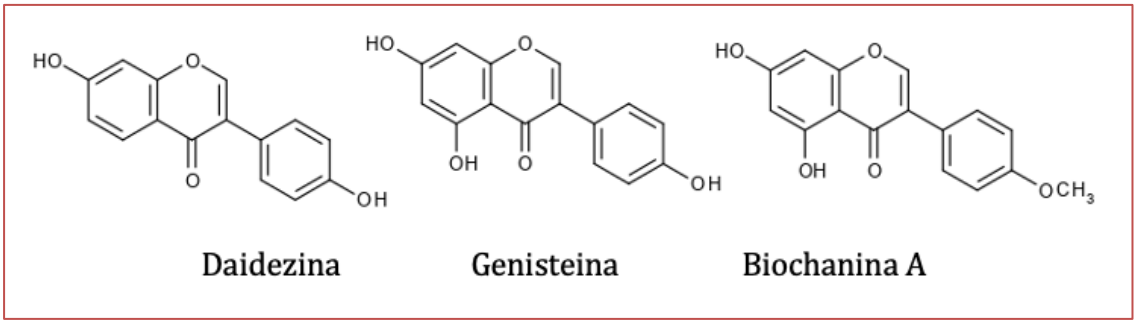
A estrutura química de um flavonóide apresenta as unidades C_6-C_3-C_6, sendo dois anéis benzênicos (C_6) ligados pela unidade C_3 que pode formar um ciclo ou não (figura 16).

Figura 16. Núcleo básico dos flavonóides



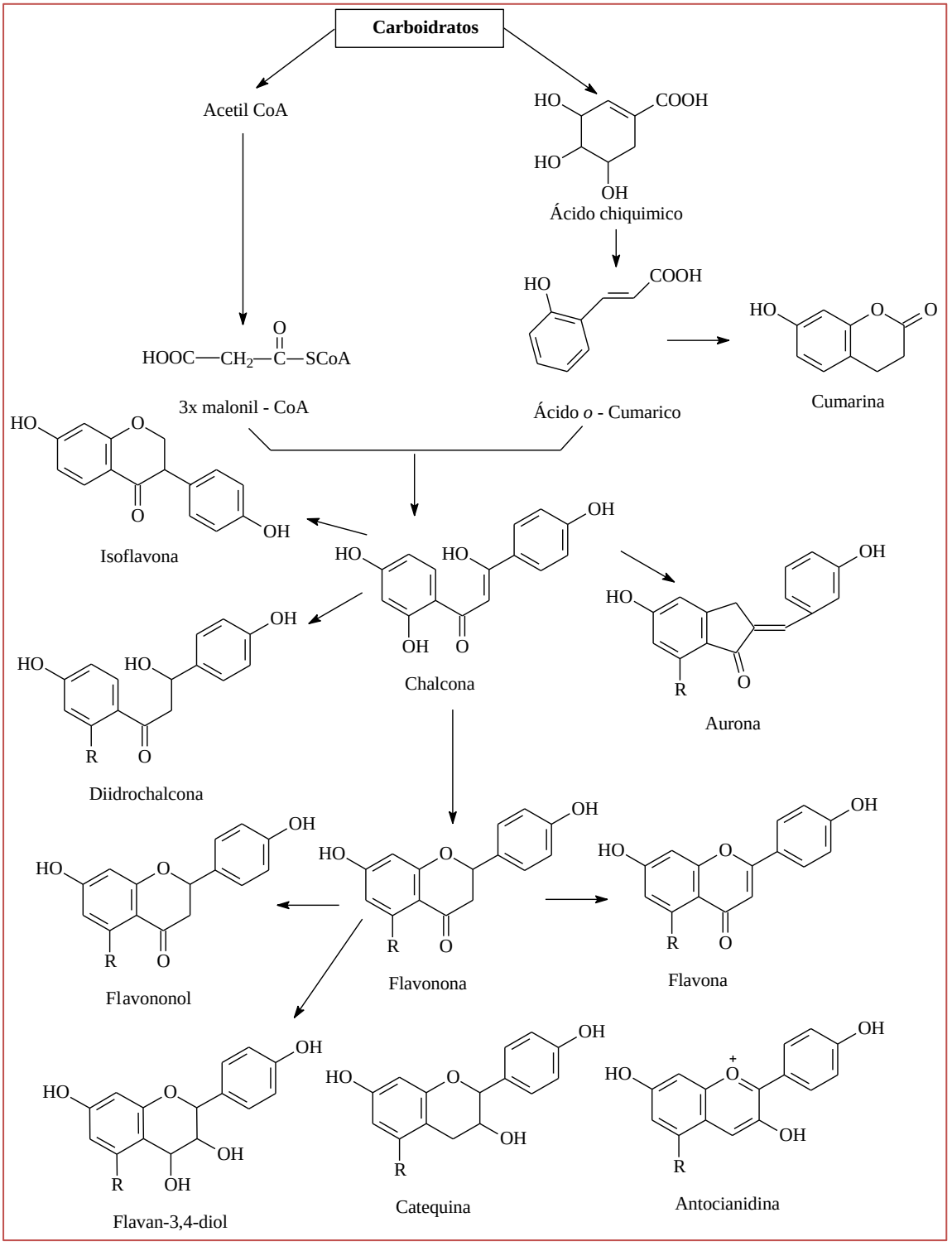
Os flavonóides têm despertado muito interesse em pesquisas, visto que apresentam uma grande diversidade de atividades biológicas observadas *in vitro*, tais como: efeito antioxidante, modulação da atividade enzimática e inibição da proliferação celular, exercendo efeitos benéficos no organismo, bem como o uso do seu potencial terapêutico (JUCÁ et al, 2020). Alimentos contendo soja são bastante consumidos para prevenção de doenças como, por exemplo, proteção contra o câncer, redução de osteoporose, melhora dos sintomas da menopausa (DOERGE, 2002). As duas principais isoflavonas são a genisteína e daidezina (Figura 17).

Figura 17. Representação estrutural de isoflavonas presentes na soja



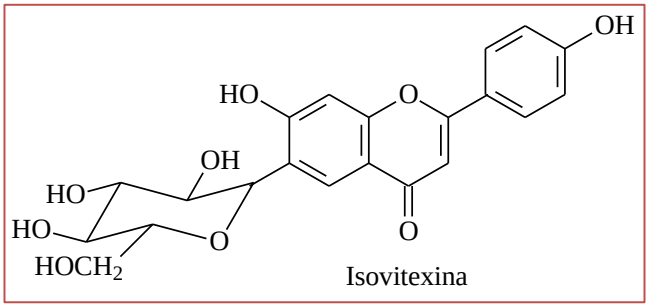
A figura 18 mostra a biossíntese dos principais tipos de flavonóides presentes em plantas, partindo-se do ácido chiquímico e três unidades de malonil-CoA que se ligam com a eliminação de CO_2.

Figura 18. Biossíntese de flavonóides, mostrando os principais tipos



Segundo Matos (2000), a Isovitexina (Figura 19) um C-glicosídeo de flavona é um dos componentes isolados da fração do extrato com ação anti-hipertensiva obtido de *Cecropia glaziovii* Sneth (Torém).

Figura 19. Representação estrutural da isovitexina

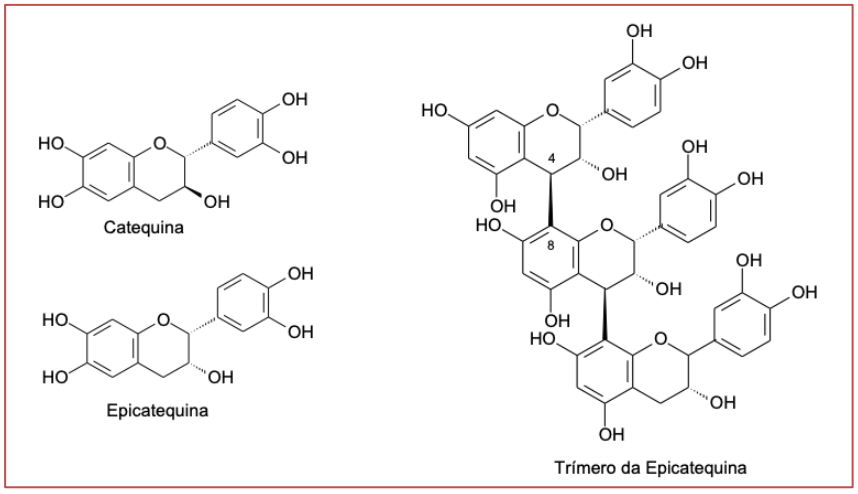


1.4.2 TANINOS CATÉQUICOS OU CONDENSADOS

As catequinas formam pequenos polímeros (oligômeros) que não são hidrolisáveis na presença de ácidos ou bases, pois, a ligação entre os monômeros ocorre entre o carbono-4 de uma unidade com o carbono-8 de outra unidade. O trímero da epicatequina contribui para a adstringência de alimentos e bebidas como também os galotaninos e são importantes comercialmente para curtição do couro de animais (DEWICK, 2002).

O chá da colônia (*Alpinia zerumbet*) utilizado popularmente para baixar a pressão arterial apresentou como principais constituintes hipotensores os conhecidos antioxidantes catequina e epicatequina (Figura 20) (COSTA *et al.,* 1998).

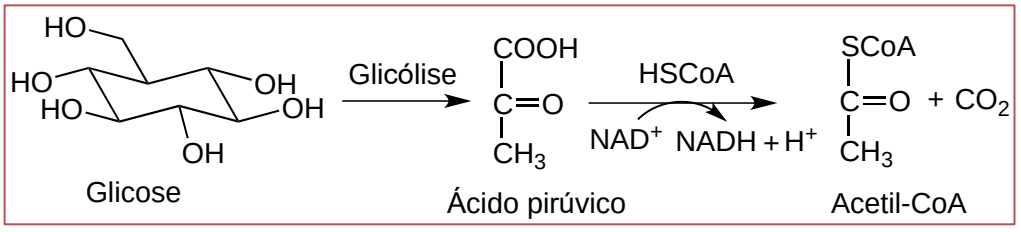
Figura. 20. Taninos catéquicos hipotensores da planta medicinal colônia



1.5. COMPOSTOS DERIVADOS DO ACETATO (ACETIL-COA)

Os grupamentos acetatos são produzidos principalmente através da via glicolítica em que os carboidratos são hidrolisados a glicose que sofre a sua oxidação transformando-se em ácido pirúvico que através de uma descarboxilação oxidativa gera o grupamento acetil-Coenzima A (Figura 21).

Figura 21. Sumário da reação de glicólise dos açucares



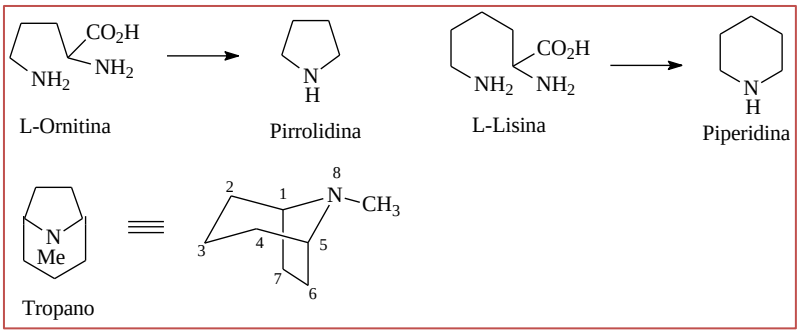
Os derivados do acetato podem ser classificados, segundo a via metabólica em três grupos:

- Derivados do acetato, via ciclo do ácido cítrico - alcalóides alifáticos (Pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piridínicos e piperidínicos, quinolizidínicos tetracíclicos), glicosídeos cianogênicos.
- Derivados do acetato, via ácido mevalônico – Terpenóides, esteróides e carotenóides
- Produtos de condensação do acetato – ácidos graxos, policetídeos (compostos aromáticos), acetogeninas.

1.5.1. DERIVADOS DO ACETATO VIA CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO - ALCALÓIDES ALIFÁTICOS E GLICOSÍDEOS CIANOGÊNICOS

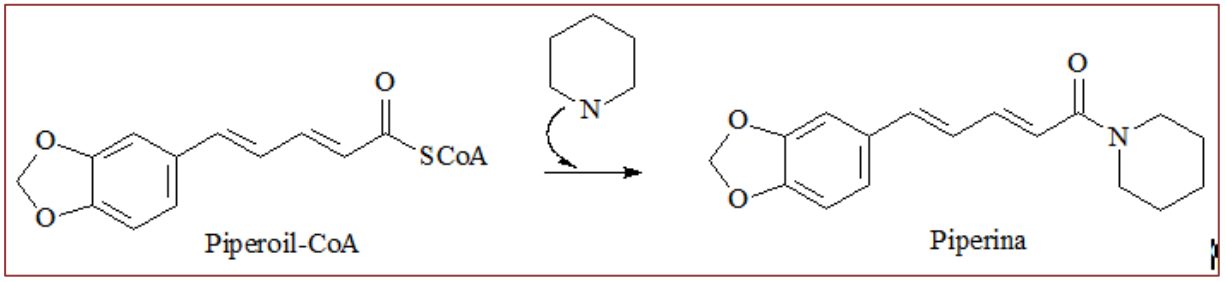
Os aminoácidos alifáticos ornitina e a lisina são os principais precursores dos alcalóides alifáticos. A ornitina é um aminoácido não protéico formado no ciclo da uréia em animais e fornece o anel pirrolidínico que também faz parte dos alcalóides tropânicos. A L-lisina um homólogo da ornitina também é precursor dos alcalóides com anéis de seis membros denominados piperidínicos DEWICK, 2002). A nicotina contém o núcleo pirrolidínico e a cocaína é um alcalóide tropânico (Figura 22).

Figura 22. Biossíntese do alcalóide alifático tripfofano



A piperina, principal responsável pelo sabor picante da pimenta preta (*Piper nigrum*), é formada pela reação entre o ácido pipérico na forma de éster da Coenzima A com a piperidina (Figura 23)

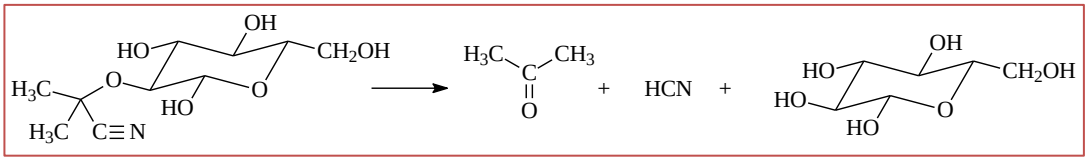
Figura 23. Biossíntese da piperina



GLICOSÍDEOS CIANOGÊNICOS

Glicosídeos cianogênicos presentes em plantas liberam ácido cianídrico (Figura 24) quando estas são trituradas. Algumas plantas que contém estes compostos são bambu (Bambura arundinacea), macacheira (*Manihot dulcis*), mandioca (manihot esculenta), Maracujá (*Passiflora edulis*, em altas doses). Os sintomas de intoxicação são cianose, nervosismo, tontura, visão diminuída, morte por anoxia (LORENZI e MATOS, 2002).

Figura 24. Formação de HCN a partir de glicosídeo cianogênico

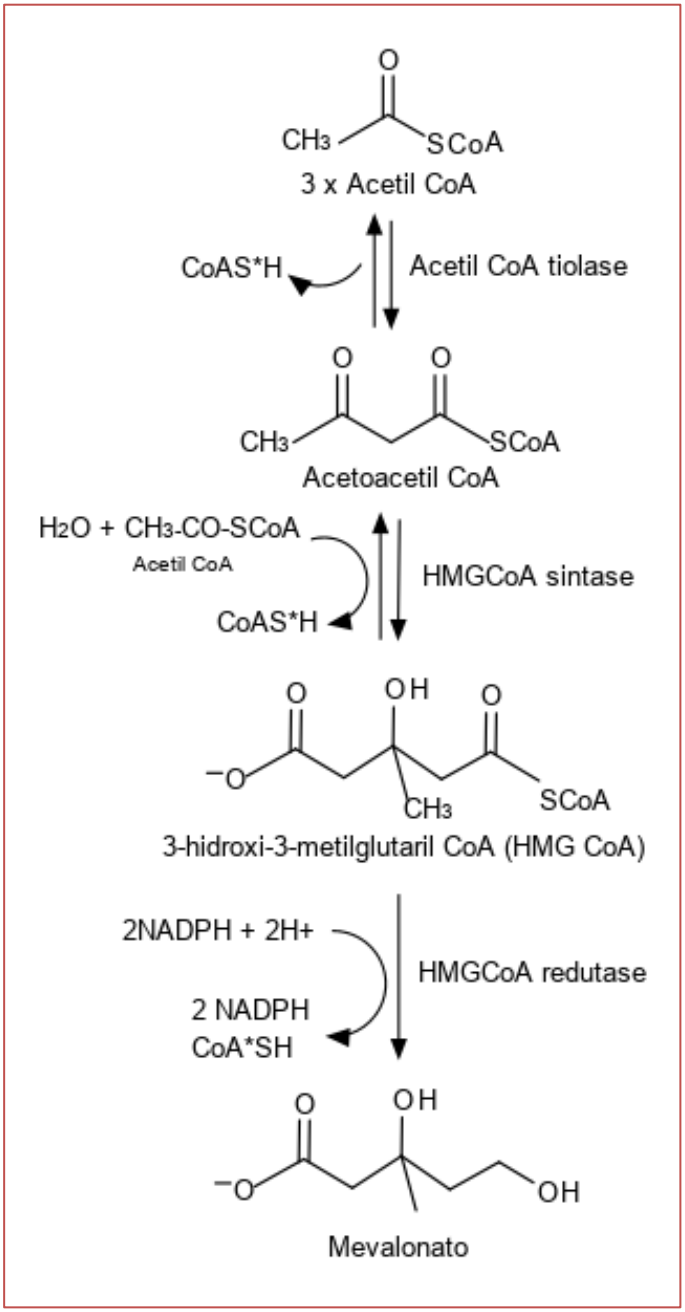


1.5.2 DERIVADOS DO ACETATO, VIA ÁCIDO MEVALÔNICO – TERPENÓIDES, ESTERÓIDES E CAROTENOIDES

TERPENÓIDES

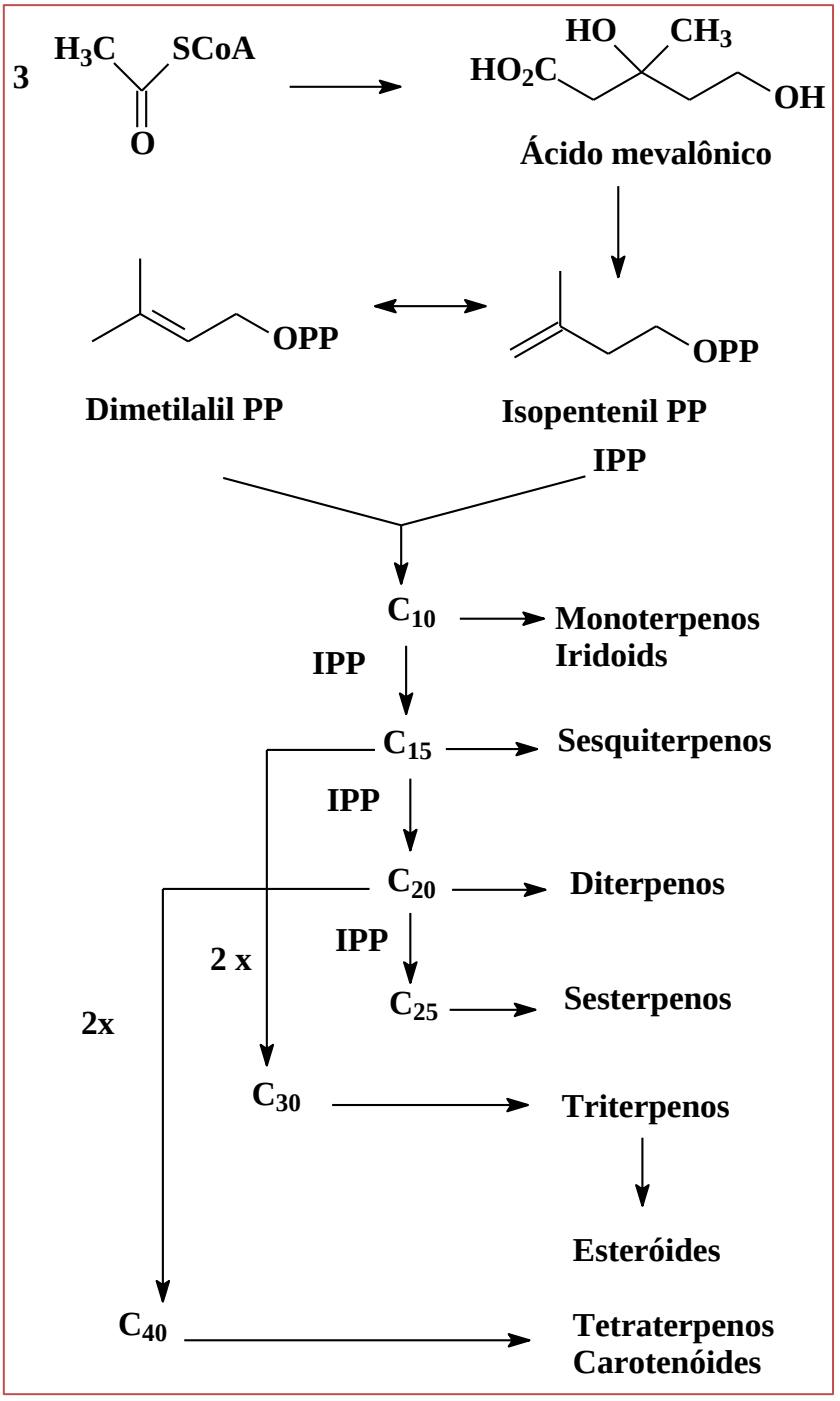
Os terpenóides formam uma larga família com estruturas bastante diversas derivadas das unidades isoprênicas C_5. Na biossíntese, 3 moléculas de Acetil-CoA formam o ácido mevalônico (Figura 25).

Figura 25. Biossíntese do ácido mevalônico



O ácido mevalônico sofre descarboxilação e desidratação para formar isopentenil pirofosfato que se condensa com dimetilalil pirosfofato para dar origem aos monoterpenos (C_{10}) e assim por diante são formados os outros terpenos (Figura 26).

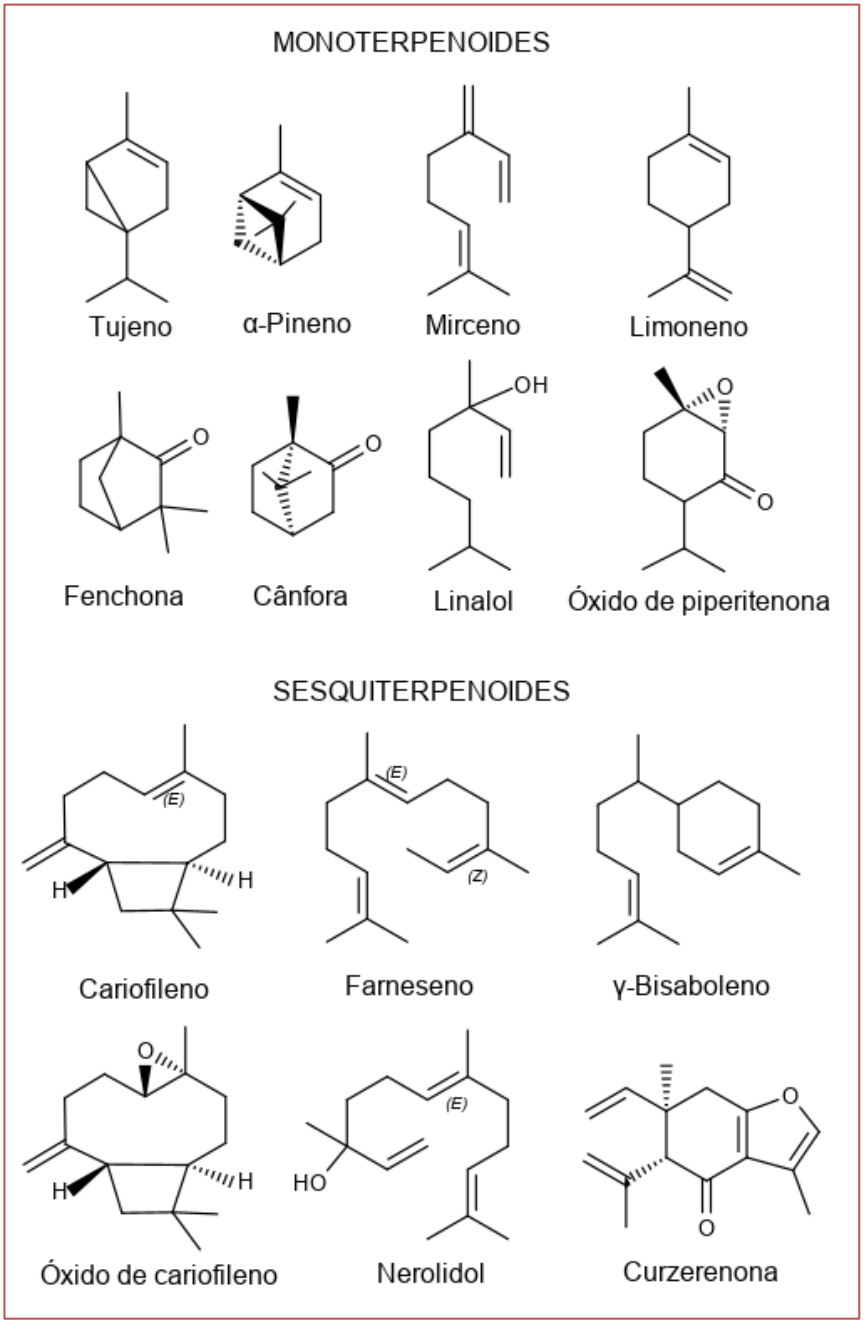
Figura 26. Biossíntese dos terpenóides



MONOTERPENOS E SESQUITERPENOS

Monoterpeneos e sesquiterpenos são compostos hidrocarbonados gerados pela condensação de duas e três unidades isoprênicas de pirofosfato de dimetil-alila (DMAPP), respectivamente. Estes compostos estão entre os principais constituintes dos óleos essenciais, veja exemplos na Figura 27 de terpenóides, incluindo os hidrocarbonetos (terpenos) e derivados oxigenados.

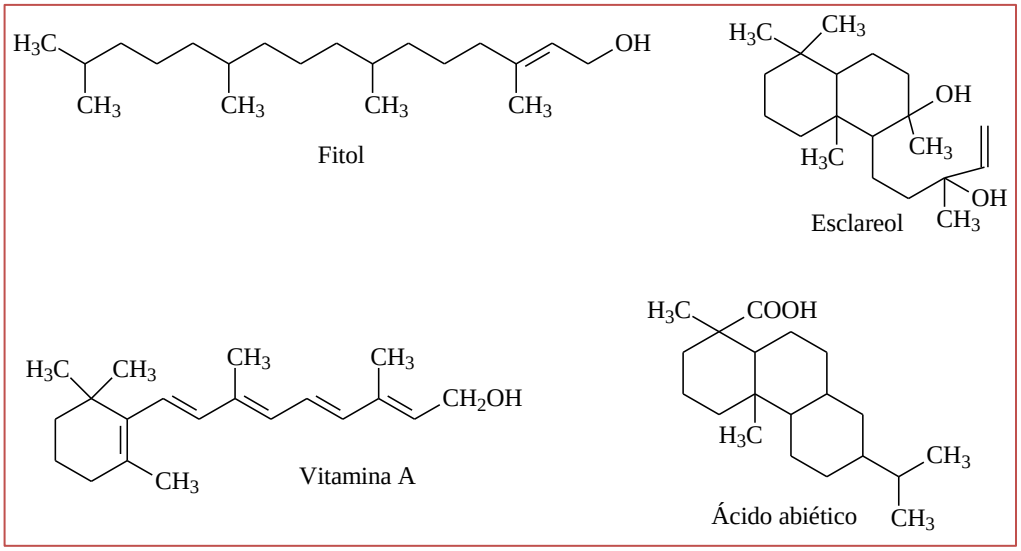
Figura 27. Exemplos de monoterpenóides e sesquiterpenóides



DITERPENOS

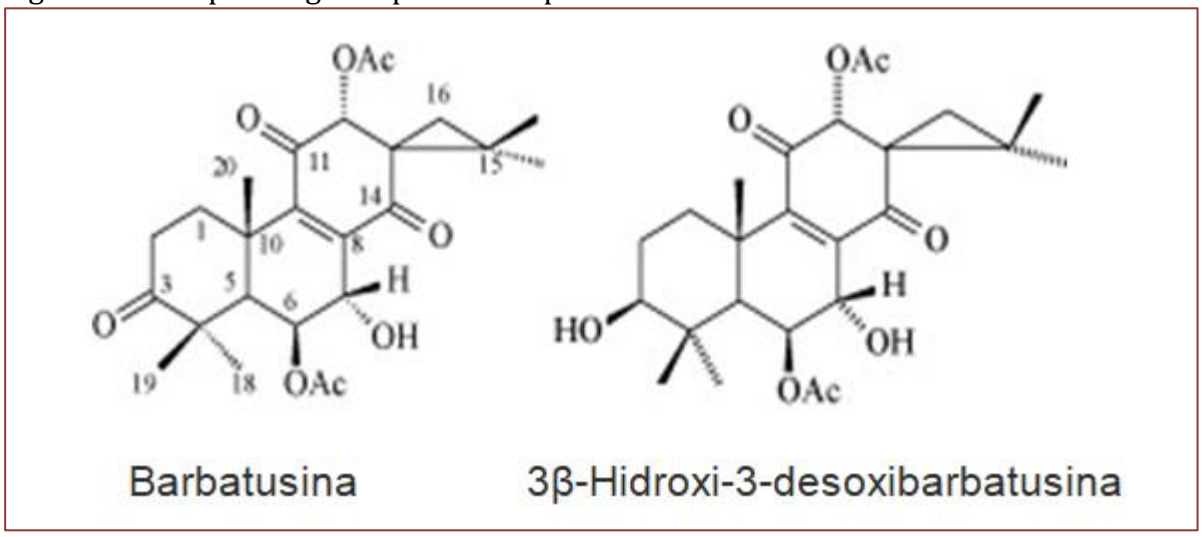
Os diterpenos são formados pela união de quatro unidades de isopreno e são encontrados principalmente nas resinas de plantas. Eles se apresentam com estruturas acíclicas como o fitol, monocíclicas como a vitamina A, bicíclica, esclareol, tricíclica como ácido abiético que está presente em grandes quantidades na resina de Coníferas e tetracíclico como a barbatusina. As estruturas dos três primeiros tipos estão representadas na Figura 28.

Figura 28. Estruturas de diterpenos alicíclico, monocíclico, bicíclico e tricíclico.



A barbatusina (Figura 29) foi isolada de *Plectranthus barbatus* Andr (malva santa) e outras espécies de *Plectranthus.* Embora seja principalmente utilizado pela população para distúrbios gástricos, várias ações farmacológicas já foram testadas e comprovadas para *P. barbatus* envolvendo compostos isolados de suas folhas, caule e raízes. Entre os aspectos farmacológicos estudados e comprovados destacam-se: ação hipotensiva, inotrópica positiva, cardiovascular, bronco-dilatadora, ativação da adelilato ciclase, inibição da agregação de plaquetas (antimetastase), antitumoral, antinociceptivo e antiinflamatório (COSTA, 2006). A presença de compostos gastroprotetores na planta *Plectranthus barbatus* certificou o seu uso popular (Rodrigues et al., 2010).

Figura 29. Compostos gastroprotetores presentes em *Plectranthus barbatus*

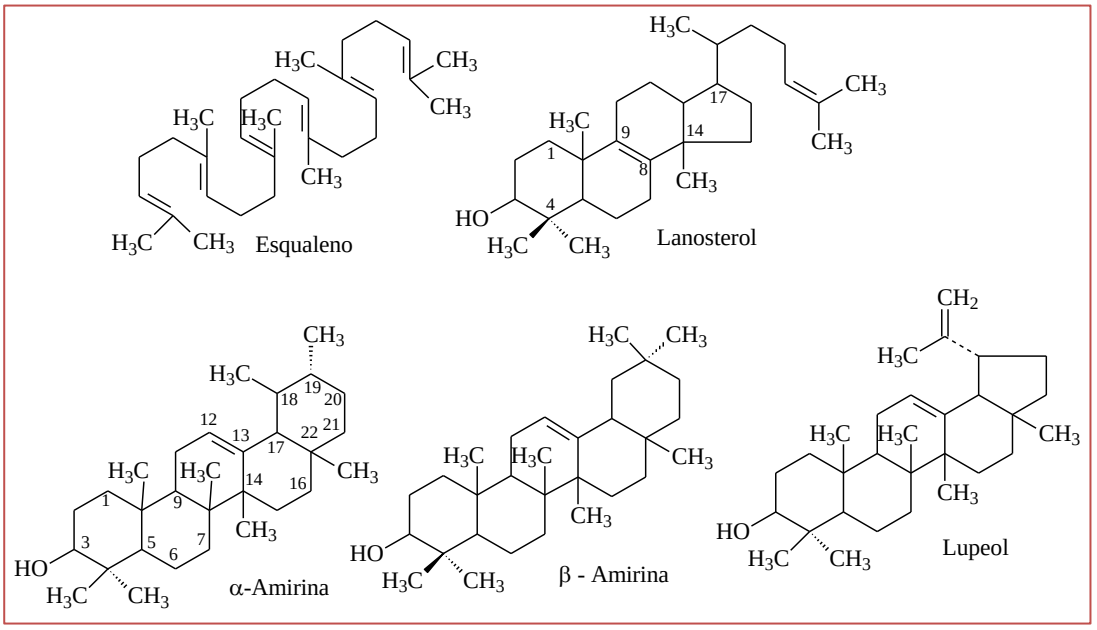


TRITERPENOS

Os triterpenos estão largamente distribuídos no reino vegetal e animal, onde ocorrem no estado livre, como ésteres e glicosídeos. Eles podem ser classificados em três grupos: acíclico (Ex.: esqualeno), tetracíclico (Ex.: lanosterol) e pentacíclico (Ex.: α-amirina, β-amirina e lupeol). As estruturas destes compostos estão mostradas na figura 30.

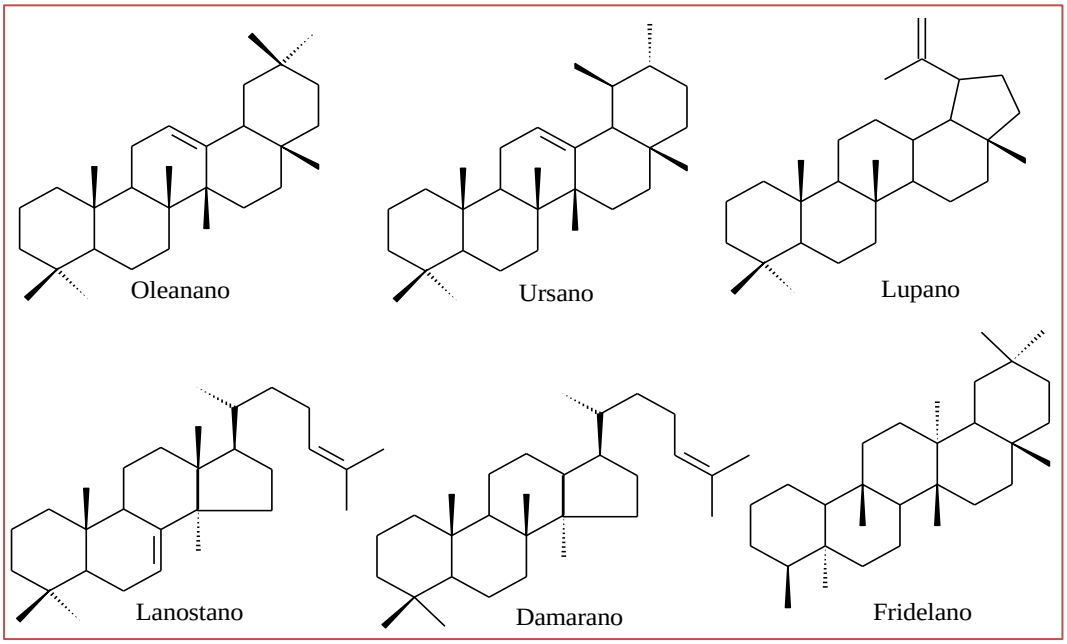
Muitas conversões de um grupo para outro podem ser observadas. Algumas delas envolvem a mudança de um –COOH para CH_3 ou para CH_2OH (IKAN, 1991).

Figura 30. Estruturas de alguns triterpenos comuns em plantas



Os triterpenos mais comuns em plantas podem ser agrupados em seis tipos de esqueleto: oleanano, ursano, lupano, lanostano, damarano e fridelano (Figura 31).

Figura 31. Esqueletos dos diversos tipos de triterpenos



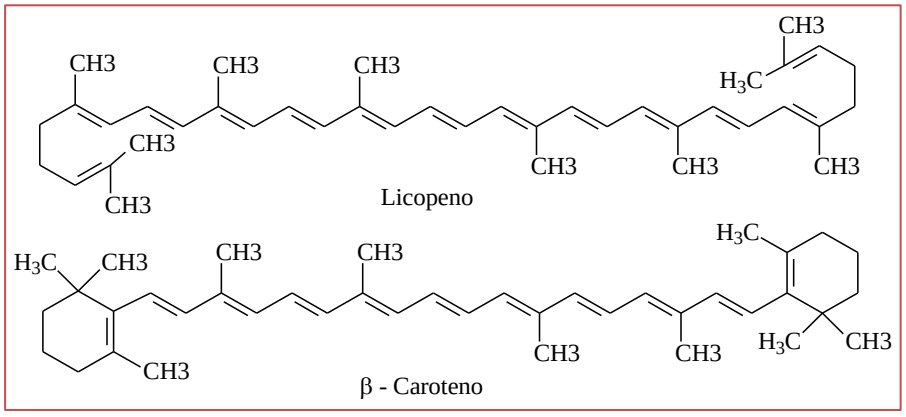
CAROTENÓIDES (TETRATERPENOS – C_{40})

Os carotenóides pertencem a uma família de pigmentos naturais encontrada em plantas e animais, de natureza lipofílica. Existem mais de 600 carotenóides conhecidos na natureza. Todos eles somente são sintetizados nas plantas, portanto as plantas são a fonte dos carotenóides presentes nos animais e nos seres humanos. No organismo animal os carotenóides estão dissolvidos nas gorduras ou combinados com proteínas na fase aquosa. Nas plantas superiores são encontrados nas folhas juntamente com a clorofila e constituem ainda os principais pigmentos de certas flores amarelas, laranja e vermelhas e de alguns microrganismos (IKAN, 1991).

Os carotenóides estão divididos em dois grupos: hidrocarbonetos e xantofilas.

Os carotenos cor de laranja α-, β- e γ-carotenos são encontrados na cenoura dentre outros alimentos. O licopeno é um carotenóide vermelho presente no tomate, goiaba e melancia. Quimicamente, os carotenóides apresentam uma estrutura com uma cadeia longa de ligações duplas conjugadas. Esta estrutura é responsável pela capacidade de seqüestrar os radicais livres. O beta-caroteno é o mais clássico exemplo a esse respeito, atuando também como filtro U.V. (280 - 320nm) (Figura 32).

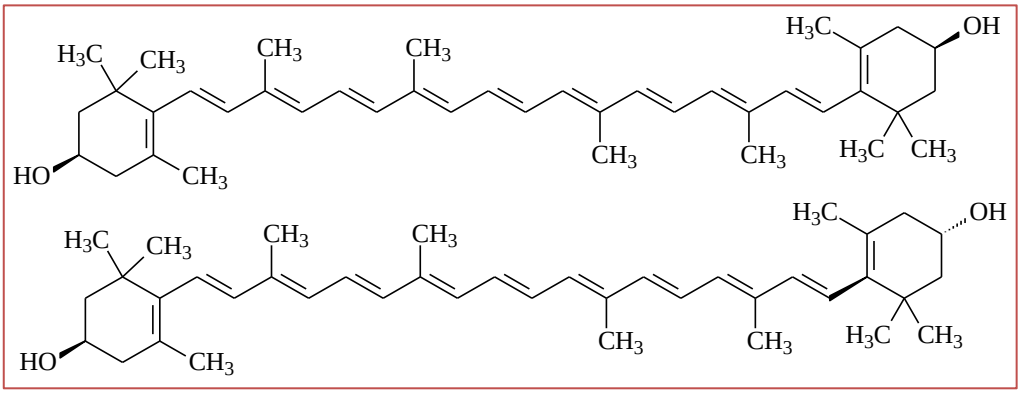
Figura 32. Representação estrutural de carotenos comuns nos alimentos



XANTOFILAS, DERIVADOS OXIGENADOS DOS CAROTENOS.

Estes compostos são álcoois, aldeídos, cetonas, epóxidos e ácidos solúveis em etanol. Como exemplo zeaxantina e luteína (Figura 33) A luteína vem sendo estudada com grande interesse em oftamologia, porque há comprovações de que pode prevenir a degeneração macular causada pelo envelhecimento.

Figura 33. Representação estrutural de Zeaxantina (acima) e Luteína



SAPONINAS

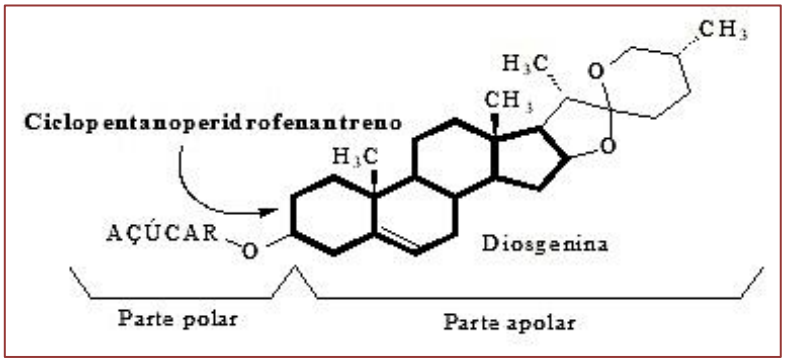
Extratos aquosos de diversas plantas quando agitados fortemente produzem espuma persistente. As substâncias dissolvidas no extrato, responsáveis por esta atividade, são conhecidas como saponinas (Figura 34). Esta propriedade é devida à sua natureza anfifílica, pois possui uma parte polar (açúcar) e outra apolar constituída por uma molécula de esteróide de triterpeno (sapogenina). α- e β-amirinas, lupeol e ácido betulínico são triterpenos presentes em saponinas.

Uma das principais plantas que contêm saponinas esteroidais é a *Dioscorea spiculiflora* e como exemplos de plantas com saponinas triterpênicas o *Ziziphus joazeiro* (juazeiro)

cuja sapogenina é o ácido betulínico e a *Luffa operculata*. *Luffa operculata* é o nome botânico da buchinha-do-norte ou cabacinha, uma planta medicinal usada popularmente no tratamento das rinites e rinossinusites (MENON-MIYAKE *et al.,* 2005).

De todas as arvores do nordeste brasileiro, o juazeiro é a mais tipicamente sertaneja, uma planta-símbolo das caatingas. As raspas da entrecasca ricas em saponinas, servem de sabão dentifricio. A casca é excelente tônico capilar para prevenir a calvície e caspa, quando em infusão ou macerada, é anti-seborréica. A água do fruto serve para clarear e amaciar a pele (LORENZI e MATOS, 2002).

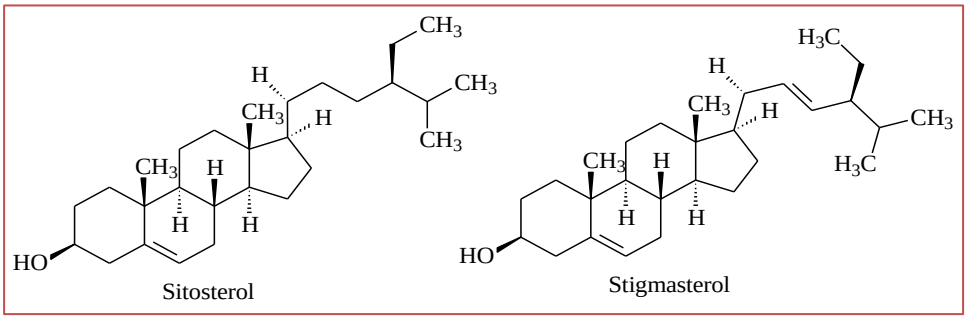
Figura 34. Representação estrutural da saponina



ESTERÓIDES DE PLANTAS

Sitosterol e stigmasterol são os esteróides mais abundantes nas plantas e ocorrem muitas vezes em mistura (Figura 35). O esqualeno e lanosterol são intermediários da biossíntese dos esteróides. As principais diferenças entre estruturas de esteróides e triterpenos são que todos os esteróides apresentam o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno e a ausência de metila ligada ao carbono quatro no anel A.

Figura 35. Principais esteroides de plantas



1.5.3 PRODUTOS DE CONDENSAÇÃO DO ACETATO – ÁCIDOS GRAXOS, ACETOGENINAS, POLICETÍDEOS AROMÁTICOS: COMPOSTOS AROMÁTICOS SIMPLES E ANTRAQUINONAS.

ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos mais comuns nas plantas apresentam cadeia linear com número par de carbonos. Estes são formados pela condensação de Claisen de unidades de acetil-CoA (C_2), cujas carbonilas são depois reduzidas para formar as cadeias lineares. Ácidos graxos, com número ímpar de átomos de carbono ou com ramificações estão presentes em pequenas quantidades nas gorduras animais, microrganismos ou em algas.

Os ácidos graxos em geral encontram-se na forma de ésteres de glicerina (óleos vegetais) sendo saturados e insaturados. As duplas apresentam isomeria cis. Existem também ácidos graxos com tripla ligação, hidroxila e anéis. A análise de ácidos graxos é feita por cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massas dos derivados metilados por reação de transesterificação com metanol e àcido sulfúrico.

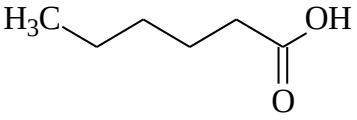
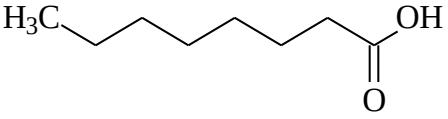
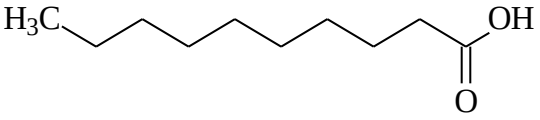
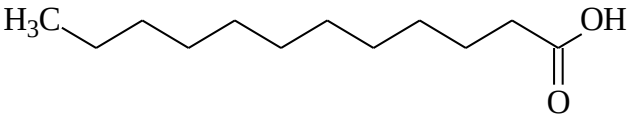
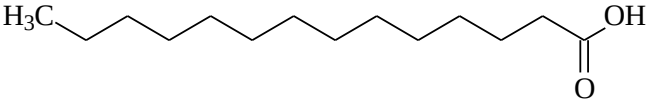
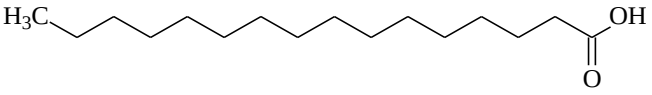
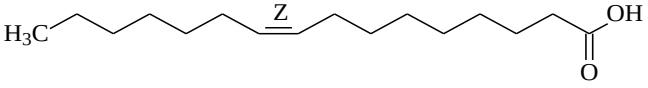
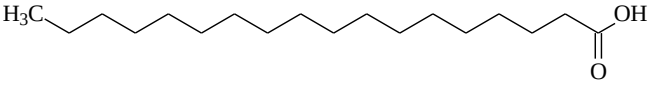
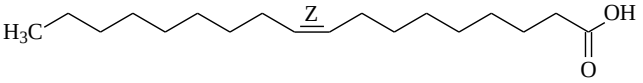
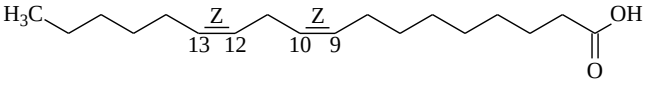
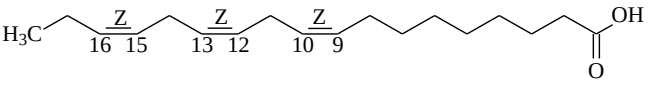
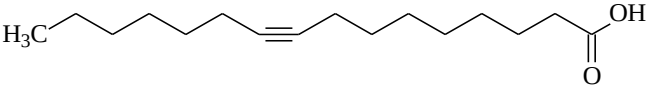
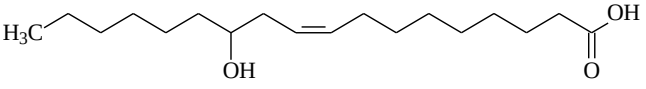
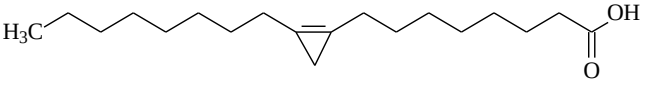
O ácido estercúlico que apresenta anel ciclopropênico, está presente no óleo de *Pachira aquática*, uma árvore muito utilizada para fazer sombra no nordeste. Seus frutos são grandes e apresentam sementes de aproximadamente 4 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro. Quando assadas lembram o cheiro de chocolate, no entanto o seu consumo é desaconselhável devido à presença dos ácidos ciclopropênicos. O ácido estercúlico é um inibidor da Δ^9 dessaturase que converte o ácido esteárico em ácido oléico sendo potencialmente perigoso aos humanos e pode alterar a permeabilidade da membrana e inibir a reprodução (DEWICK, 2002)

Os ácidos graxos insaturados também são denominados ω-3, ω-6 e ω-9 e esta numeração é feita iniciando a contagem a partir da metila do final da cadeia do ácido.

Além da alimentação, os óleos vegetais estão sendo bastante utilizados na preparação do biodiesel, que consiste na reação de transesterificação dos triglicerídeos com metanol ou etanol, catalizada principalmente por base.

A Tabela 1 mostra os nomes e estruturas de ácidos graxos comuns em plantas.

Tabela 1. Estruturas de ácidos graxos presentes em plantas.

Capróico C6:0	
Caprílico C8:0	
Cáprico C10:0	
Láurico C12:0	
Mirístico C14:0	
Palmítico C16:0	
Palmitoleico C16:1	
Esteárico C18:0	
Oléico C18:1 (ω-9)	
Linoleico C18:2 (ω-6)- 9,12	
α-Linolênico C18:3 (ω-3)- 9,12,15	
Taririco	
Ricinoleico	
Estercúlico	

ACETOGENINAS

As acetogeninas são usualmente caracterizadas pela longa cadeia alifática de 35 a 37 átomos de carbono combinados com uma unidade de 2-propanol para formação de uma gama-lactona. Apresentam uma metila terminal, o anel γ-lactona α-β-insaturado (as vezes rearranjados para cetolactonas), com um, dois ou três anéis tetrahidrofuranos (THF), localizados ao longo da cadeia hidrocarbonada e um número de grupos oxigenados (hidroxilas, acetoxilas, cetonas e epóxidos) e a presença de duplas também pode ser verificada (ALALI *et al.,* 1999). A figura 36 mostra as estruturas de acetogeninas extraídas da semente da ata e graviola.

As acetogeninas são compostos bastante comuns na família das Annonaceas (HOOP *et al,*1998) sendo classificadas em:

1. Com um anel tetraidrofurano – mono tetrahidrofurano (THF)

2. Com dois anéis tetraidrofuranos adjacentes – bis-THF

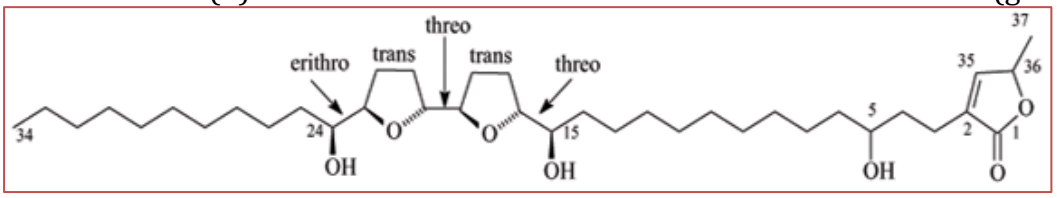
3. Com dois anéis tetraidrofuranos não adjacentes – bis- THF não adjacentes

4. Com três anéis tetraidrofuranos – tri-THF

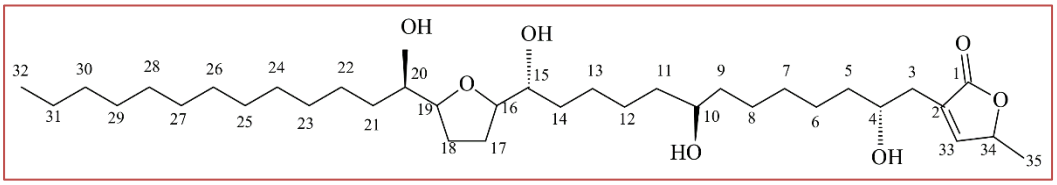
5. Sem anel tetraidrofurano

A numeração dos carbonos desses compostos é iniciada pela carboxila da lactona.

Figura 36. Representação da estrutura de acetogenina extraídas de: (a) semente de *Annona squamosa* (ata, pinha) mostrando a estereoquímica dos anéis bis tetraidrofurânicos e (b) Annonacina extraída da semente da *Annona muricata* (graviola)



(a)



(b)

AÇÃO DAS ACETOGENINAS

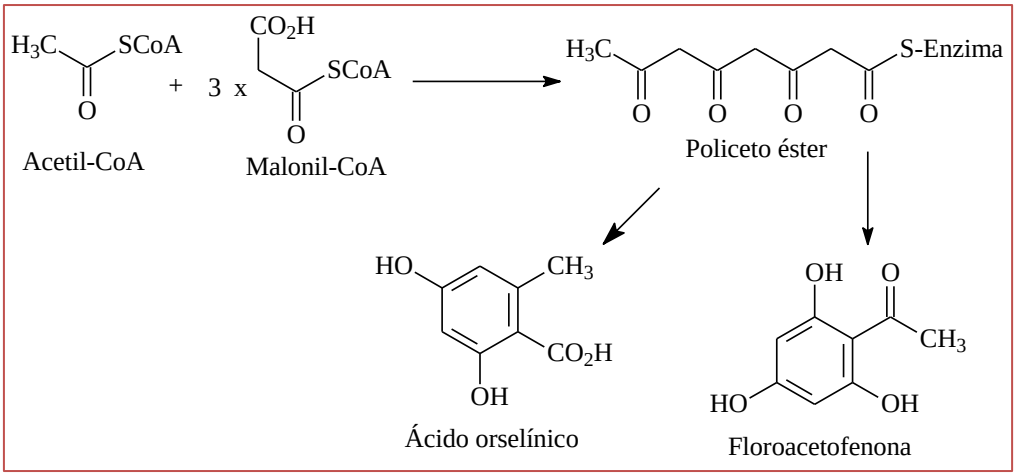
Acetogeninas das plantas da família Anonnacea são conhecidas pela variedade de atividades farmacológicas como anticancer, anticonvulsante, anti-artritica, antiparasitica, antimalarial, hepatoprotetora, antidiabetica (Moghadamtousi et al, 2015), leishmanicida (Vila-Nova et al, 2011) e larvicida contra *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus,* vetores da dengue (Rodrigues et al., 2019).

POLICETÍDEOS AROMÁTICOS

COMPOSTOS FENÓLICOS SIMPLES

Os policetídeos são formados por condensação das moléculas de acetil-CoA com malonil-CoA para gerar um policeto éster que dependendo do dobramento e reações intramoleculares de Claisen e Aldol, dão origem a compostos fenólicos simples contendo oito átomos de carbono (Figura 37).

Figura 37. Biossíntese simplificada de compostos fenólicos simples



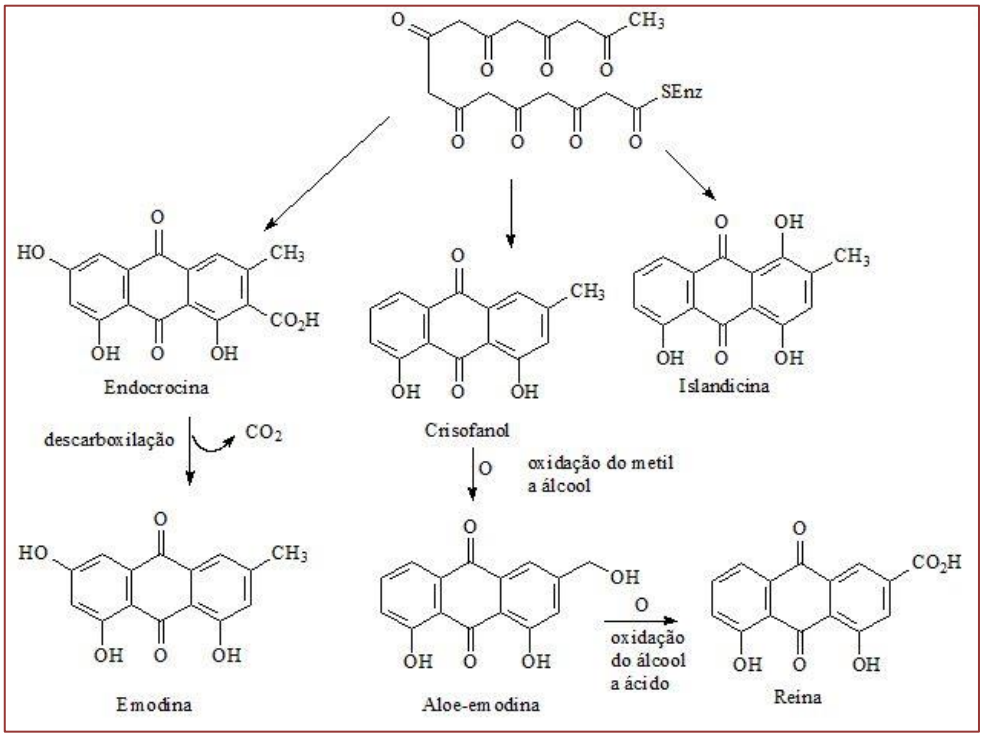
ANTRAQUINONAS

Antraquinonas constituem os pigmentos presentes em muitas plantas. O estudo fitoquímico de várias espécies de Senna, *Senna alata* (manjerioba grande), *Senna occidentalis* (manjerioba comum) e Senna obtusifolia (mata-pasto) revelou a presença das antraquinonas crisofanol, emodina e reína. A literatura etnofarmacológica cita o uso

das folhas das duas primeiras espécies para o tratamento de impingens e panos brancos, tratamento local de herpes, sarna e outras dermatofitoses (MATOS, 2000).

Na biossíntese das antraquinonas, a acetil-CoA se condensa com sete malonil-CoA formando o ceto éster de 16 átomos de carbono (Figura 38) que através de reações de descarboxilação, oxidação e desidratação dá origem a um grande número de estruturas.

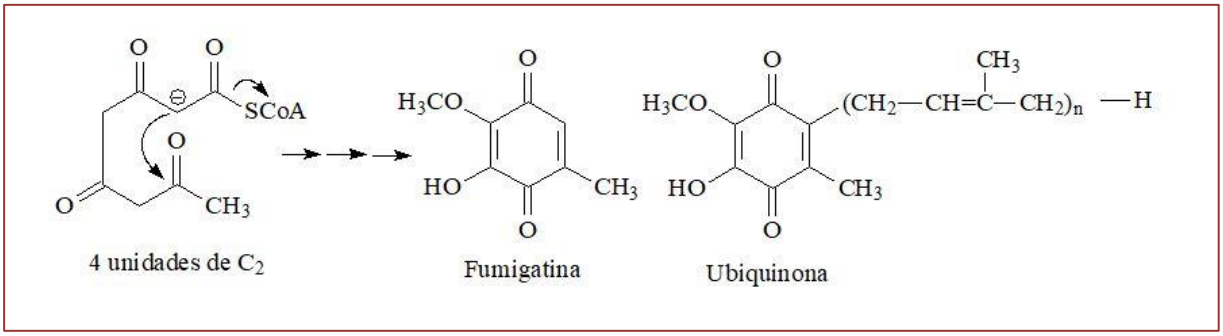
Figura 38. Biossíntese simplificada de algumas antraquinonas



BENZOQUINONAS

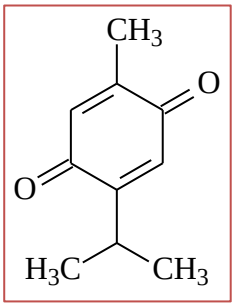
Na natureza estas substâncias são encontradas em fungos, insetos e plantas superiores. A sua pouca ocorrência se deve ao fato de ser bastante reativa. Na biossíntese das benzoquinonas 4 unidades de acetil-CoA se condensam para a sua formação. A Figura 39 mostra exemplos de naftoquinonas como a fumigatina e ubiquinona (coenzima Q), a mais importante benzoquinona produzida pelas plantas superiores.

Figura 39. Proposição da Biossíntese das benzoquinonas a partir de ceto-éster formado por quatro unidades C_2.



A timoquinona (Figura 40) também é uma benzoquinona cuja biossíntese é via ácido mevalônico, sendo portanto um monoterpeno oxigenado. Esta benzoquinona presenta propriedades antiinflamatória e anticâncer (EL GAZZAR *et al.*, 2006; GALI-MUHTASIB *et al.*, 2006). A timoquinona está presente no óleo essencial das folhas do mastruz (*Chenopodium ambrosioides*). No Nordeste brasileiro é muito utilizado pela população que usa uma preparação feita com as folhas do mastruz batidas com leite no liquidificador para tratamento de garganta inflamada e o emplastro para contusões. O princípio ativo da planta ainda não foi identificado, todavia esta benzoquinona deve contribuir para a ação antiinflamatória da planta.

Figura 40. Representação estrutural da Timoquinona

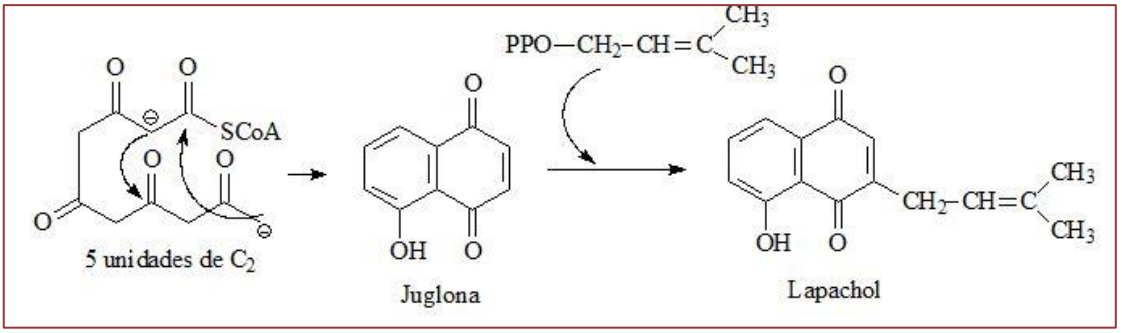


NAFTOQUINONAS

A biossíntese das naftoquinonas envolve a ciclização do ceto-éster formado por 5 unidades de C_2, que após reações de ciclização fornece a juglona. Este composto é intermediário da biossíntese do lapachol por reação com pirofosfato de dimetilalila (Figura 41). O lapachol é o principal constituinte dos Pau d'Arcos ou Ipês (*Tabebuia*

avellanedeae, T. serratifolia e T. impetiginosa). Esta substância e outros derivados encontrados nas cascas do tronco da planta são dotados de forte ação antiinflamatória, antimicrobiana, antialérgica, cicatrizante e antitumoral (MATOS, 2000).

Figura 41. Biossíntese do lapachol (naftoquinona)



02 Processos de extração de produtos naturais

O interesse dos homens por substâncias orgânicas teve sua origem ainda na pré-história. Pigmentos para tintas, perfumes e produtos usados na medicina popular eram basicamente compostos orgânicos, e requeriam algum tipo de extração da sua fonte natural, usualmente plantas. Extração implica em se obter material orgânico livre de sua matriz original (células e tecidos). Muitos materiais orgânicos de origem natural, principalmente os cristalinos, foram isolados e purificados no século XIX.

Desde o isolamento do analgésico aspirina até o isolamento do taxol, usado no tratamento do câncer, uma variedade de produtos naturais fornece muitas moléculas-chave para o planejamento e desenvolvimento da pesquisa científica, o potencial parece sem limite.

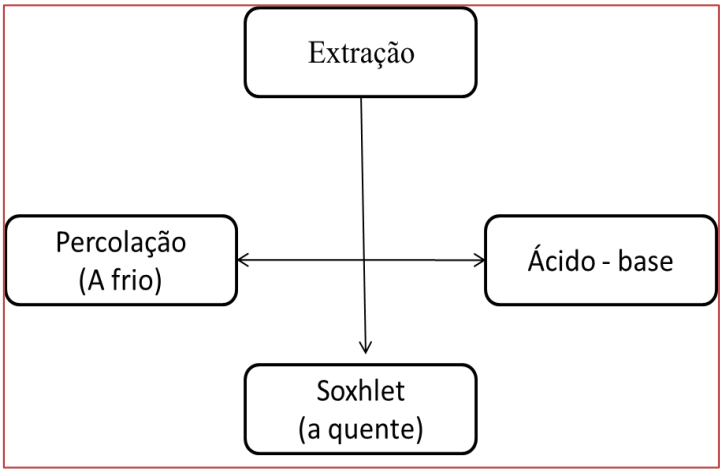
Muitos produtos naturais são difíceis de serem extraídos em experimentos de laboratório por várias razões como sua presença em pequenas quantidades, toxicidade, instabilidade, estrutura complexa, pouca disponibilidade de suas fontes ou combinações desses fatores.

O isolamento e o estudo de substâncias naturais é uma preocupação central das ciências químicas e biológicas. A bioquímica investiga a química de produtos naturais do metabolismo primário, que produz substâncias amplamente distribuídas nos seres vivos: aminoácidos, lipídios, carboidratos e macromoléculas (proteínas, polissacarídeos ácidos nucléicos). A química de produtos naturais do metabolismo secundário (especializado) é estudada por químicos orgânicos, frequentemente reconhecidos como químicos de produtos naturais (Morais e Braz Filho, 2007).

O químico dispõe de uma diversidade de procedimentos e sistemas contínuos e descontínuos para uso na extração do material biológico a partir da sua fonte natural, como por exemplo: maceração, soxhlet, percolação, enfleurage, extração por arraste com vapor d'água, marcha química, etc. Dependendo do que se deseja extrair algumas

técnicas são mais recomendadas que outras. A figura 42 mostra as técnicas mais comuns de preparação de extratos.

Figura 42. Fluxograma da preparação geral de extratos através da extração a frio, a quente e por partição utilizando solventes aquosos ácidos ou básicos e solventes orgânicos imiscíveis em água



2.1 MACERAÇÃO OU PERCOLAÇÃO

Operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado, sob a agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. A solução extrativa final é chamada de macerado. Podem ocorrer algumas variações nesta operação, visando aumentar a eficiência da extração: • Maceração Dinâmica: maceração feita sob constante agitação mecânica. • Remaceração: quando a operação é repetida utilizando o mesmo material vegetal, renovando apenas o líquido extrator.

A maceração é normalmente feita, moendo previamente o material a macerar, seguindo-se a utilização de um solvente para extração do ou dos princípios ativos.

- Não leva ao esgotamento do princípio ativo devido a saturação do líquido extrator e equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula vegetal
- Técnica simples e muito utilizada na preparação de tinturas mães em homeopatia e tinturas oficiais.
- Líquido extrator mais utilizado é o álcool ou misturas hidroalcoólicas
- A extração é feita a frio.

- A droga vegetal deve entrar em contado com o liquido extrator de 6 horas a 10 dias com agitação esporádica do recipiente.
- A tabela 2 relaciona os solventes mais comuns utilizados na preparação de extratos e suas características físicas
- Os solventes são agrupados em apolar, polar aprótico e polar prótico e ordenados por aumento de polaridade.

Tabela 2. Relação dos solventes mais comuns e suas características físicas

Solventes polares próticos					
Solvente	Fórmula química	Ponto de ebulição	Constante dielétrica	Densidade	Momento dipolar
Ácido Fórmico	H-C(=O)OH	101 °C	58	1.21 g/mL	1.41 D
n-Butanol	CH3-CH2-CH2-CH2-OH	118 °C	18	0.810 g/mL	1.63 D
Isopropanol (IPA)	CH3-CH(-OH)-CH3	82 °C	18	0.785 g/mL	1.66 D
n-Propanol	CH3-CH2-CH2-OH	97 °C	20	0.803 g/mL	1.68 D
Etanol	CH3-CH2-OH	79 °C	30	0.789 g/mL	1.69 D
Metanol	CH3-OH	65 °C	33	0.791 g/mL	1.70 D
Ácido acético	CH3-C(=O)OH	118 °C	6.2	1.049 g/mL	1.74 D
Água	H-O-H	100 °C	80	1.000 g/mL	1.85 D
Solventes polares apróticos					
Diclorometano (DCM)	CH2Cl2	40 °C	9.1	1.3266 g/mL	1.60 D
Tetraidrofurano (THF)	/-CH2-CH2-O-CH2-CH2-\	66 °C	7.5	0.886 g/mL	1.75 D
Etilacetato	CH3-C(=O)-O-CH2-CH3	77 °C	6.02	0.894 g/mL	1.78 D
Acetona	CH3-C(=O)-CH3	56 °C	21	0.786 g/mL	2.88 D
Dimetilformamida (DMF)	H-C(=O)N(CH3)2	153 °C	38	0.944 g/mL	3.82 D
Acetonitrila (MeCN)	CH3-C≡N	82 °C	37.5	0.786 g/mL	3.92 D
Dimetilsulfóxido (DMSO)	CH3-S(=O)-CH3	189 °C	46.7	1.092 g/mL	3.96 D
Solventes apolares					
Pentano	CH3-CH2-CH2-CH2-CH3	36 °C	1.84	0.626 g/mL	0.00 D
Ciclopentano	C5H10	40 °C	1.97	0.751 g/mL	0.00 D
Hexano	CH3-CH2-CH2-CH2-CH2-CH3	69 °C	1.88	0.655 g/mL	0.00 D
Ciclo-hexano	C6H12	81 °C	2.02	0.779 g/mL	0.00 D
Benzeno	C6H6	80 °C	2.3	0.879 g/mL	0.00 D
Tolueno	C6H5-CH3	111 °C	2.38	0.867 g/mL	0.36 D
1,4-Dioxano	/-CH2-CH2-O-CH2-CH2-O-\	101 °C	2.3	1.033 g/mL	0.45 D
Clorofórmio	CHCl3	61 °C	4.81	1.498 g/mL	1.04 D
Dietil-éter	CH3CH2-O-CH2-CH3	35 °C	4.3	0.713 g/mL	1.15 D

2.2 EXTRAÇÃO COM SOXHLET

O aparelho Soxhlet possui um sifão que proporciona o refluxo contínuo do solvente.

O material bruto pulverizado é colocado num cartucho de celulose, dentro do Soxhlet. O balão conectado abaixo recebe aquecimento de uma manta elétrica, fazendo com que o

solvente evapore, condense no condensador de bolas (acima e com sistema de refrigeração) passe para o Soxhlet - proceda a extração - e uma vez atingido o nível no sifão, retorne para o balão reiniciando o processo (Figura 43).

A extração ocorre normalmente por centenas de ciclos, o que corresponde às vezes a vários dias de trabalho. O princípio ativo desejado é resgatado da solução final do balão, a qual é concentrada em evaporador rotativo, a baixa pressão.

A eficiência do método depende:

- Natureza do material a ser extraído
- Natureza e polaridade do solvente
- Ligação dos lipídeos com outros componentes
- Circulação do solvente através da amostra
- Tamanho das partículas
- Umidade da amostra
- Velocidade de refluxo
- Quantidade relativa de solvente

Figura 43. Aparelho extrator Soxhlet

EXEMPLO: EXTRAÇÃO EM SOXHLET DE LIPÍDEOS DA SEMENTE DE GIRASSOL

Preparo do cartucho para extração

O cartucho de celulose é preparado conforme mostrado na Figura 44.

Figura 44. Etapas para preparação do cartucho para extração. (1) Cortar um pedaço de papel de filtro. (2) Fazer um cilindro com o pedaço cortado. (3) Grampear as duas pontas do cilindro. (4) Dobrar uma das pontas de modo a fechar uma das partes do cartucho.

Insira dentro do cartucho uma porção de algodão para evitar a saída do material sólido. Adicione cerca de 10 gramas da semente de girassol trituradas e tampe o cartucho com mais uma pequena porção de algodão.

Conecte um balão de fundo redondo de 250 ml ao aparelho de soxhlet contendo o cartucho com as sementes de girassol para extração dos lipídeos. Adicione hexano ao aparelho de soxhlet em quantidade suficiente para sifonar por 3 vezes. Acople o condensador ao extrator e aqueça o sistema por cerca de 6 horas.

Após resfriar o extrato hexânico, filtre para um balão de fundo redondo (previamente tarado) e concentre em evaporador rotativo a vácuo na temperatura de 65ºC. (Figura 45)

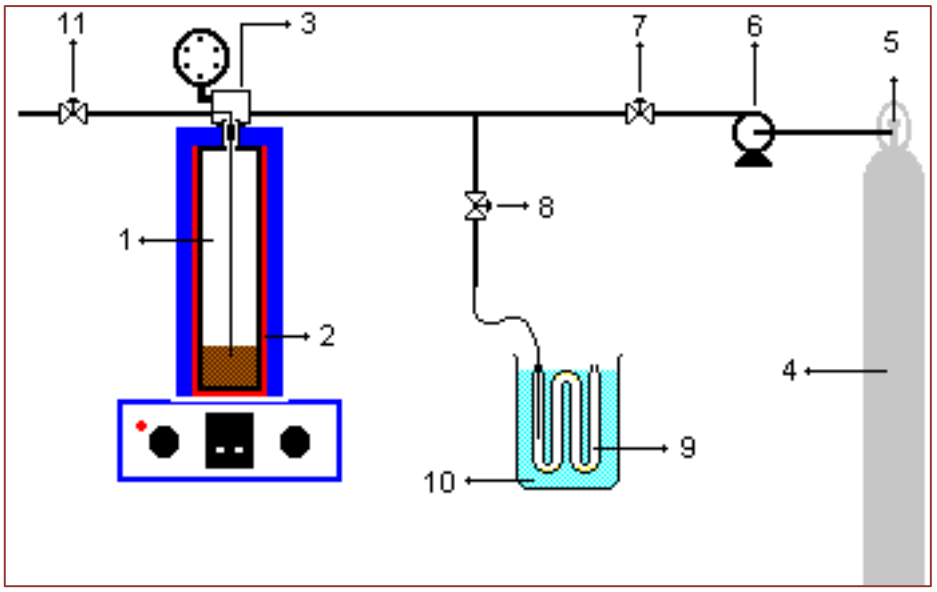
Figura 45. Evaporador rotativo a vácuo

Após concentrar os lipídeos obtidos a partir da extração pese e calcule o rendimento (3,27 g).

2.3. EXTRAÇÃO COM LIQUIDO SUPERCRÍTICO

A extração com fluido supercrítico pode proporcionar um método alternativo para remover lipídeos, sem que haja redução significativa nas propriedades organolépticas do produto. Seguindo a metodologia de Lameira et al. (1997). Pese cerca de trinta gramas da amêndoa da castanha de caju em balança analítica e coloque no extrator [1]. As válvulas do cilindro [5] e de entrada de CO_2 [7] são abertas a seguir. A quantidade de CO_2 necessária para atingir a pressão desejada deve ser bombeada, as válvulas devem ser fechadas e ligar o sistema de aquecimento. A pressão do sistema é ajustada pela retirada do gás pela válvula de coleta da fase gasosa [8]. Após atingir o equilíbrio, o sistema é mantido por 180 minutos. O sistema será depois despressurizado e a matriz sólida analisada por Soxhlet para determinar o teor de óleo remanescente (Figura 46).

Figura 46. Esquema do extrator utilizando líquido supercrítico.



Onde:1 - Extrator de 300 ml com tubo pescador; 2 - Sistema de aquecimento por manta (com variação de temperatura de 20 à 300ºC); 3 - Dispositivo de segurança (rompe acima de 200 bar); 4 - Cilindro de CO_2 com tubo pescador; 5 - Válvula do cilindro; 6 - Bomba; 7 - Válvula de entrada do CO_2 no extrator; 8 - Válvula micrométrica de coleta da fase gasosa;9 - Coletor de amostra; 10 - Banho de gelo; 11 - Válvula de coleta de fase líquida.

A quantidade de lipídeos extraída com CO_2 supercrítico é determinada, subtraindo a quantidade de lipídeos extraída da matriz sólida após a EFSC daquela total extraída da amêndoa de caju por Soxhlet. Os resultados são determinados e expressos por uma razão (R %) definida pela Equação 1:

$$R\ (\%) = (EFSC / Sox) \times 100 \quad (1)$$

onde (Sox) é quantidade total de lipídeos extraídos da amêndoa por Soxhlet e (EFSC) é a quantidade de lipídeos extraídos da matriz sólida após a EFSC.

2.4. EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE

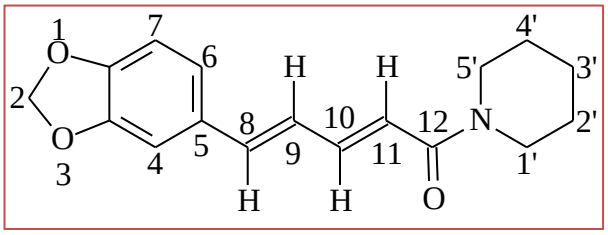
EXTRAÇÃO DA PIPERINA DA PIMENTA PRETA (*Piper nigrum* L.)

O odor e o sabor da pimenta preta são determinados pela composição dos componentes aromáticos do óleo volátil, enquanto que as características de pungência são produzidas por alcalóides da parte não volátil, dos quais a piperina é o mais importante.

A piperina (Figura 47) é uma amida do ácido pipérico e piperidina. A pimenta também contém pequenas quantidades de chavicina, piperidina e piperetina, as quais juntas dão o sabor penetrante e a pungência. A piperina é a forma trans, trans da 1-piperoilpiperidina. Os isômeros possuem diferentes configurações nas duplas ligações denominados a seguir:

- Piperina ---------- trans-trans
- Isopiperina ---------- cis-trans
- Isochavicina --------- trans-cis
- Chavicina ---------- cis-cis

Figura 47. Representação estrutural da piperina



Nenhum dos isômeros possui um nível de pungência maior do que a piperina. Tem sido sugerido que durante o armazenamento ocorre uma lenta fotoisomerização da piperina, para formar seus isômeros, diminuindo assim a sua pungência.

PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DA OLEORESINA DA PIMENTA PRETA

EXTRAÇÃO DA OLEORESINA

Pese 10 g de pimenta preta (Figura 48) moa e adicione para um cartucho para sohxlet e submeta a extração utilizando acetona como solvente. Extraia a pimenta durante 4 horas com circulação do solvente. Após este período, retire o extrato do sistema de extração de sohxlet, filtre e concentre em evaporador rotativo, obtendo-se um líquido esverdeado viscoso denominado de Oleoresina de Pimenta Preta (0,73 g). Calcule o rendimento.

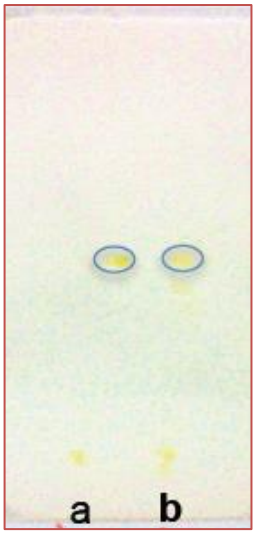
Figura 48. Pimenta preta inteira.

IDENTIFICAÇÃO DA PIPERINA A PARTIR DA OLEORESINA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Fase móvel: Acetona : Hexano (3 : 2);

Dissolva uma amostra de piperina padrão em solvente clorado (diclometano ou clorofórmio). Dissolva a oleoresina obtida no item 1 em acetona. Usando uma capilar aplique 1 microlitro da amostra e do padrão em uma placa cromatográfica de sílica gel. Elua a cromatoplaca com a fase móvel e calcule o Rf da piperina observando na oleoresina a presença da piperina (Figura 49).

Figura 49. Cromatoplaca obtida após eleição do padrão de piperina (spot a) e da amostra de oleoreina (spot b).

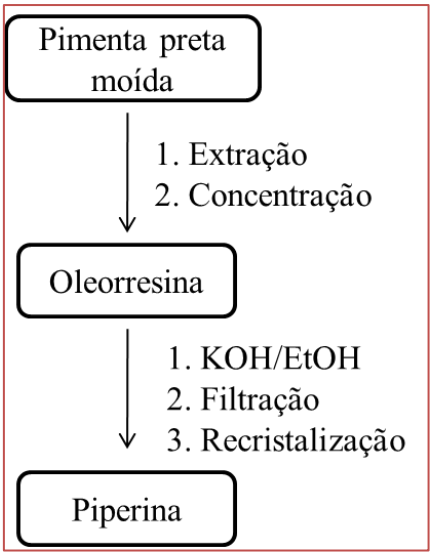


OBTENÇÃO DA PIPERINA A PARTIR DA ÓLEORRESINA

Em um balão de fundo chato de 50 mL conectado a um condensador de refluxo adicione a oleorresina de pimenta preta e 10 mL de solução de KOH 0,1 M alcoólico. Submeta a mistura a refluxo por 30 minutos e após isso resfrie.

Filtre a mistura reacional em funil de Buchner e o sólido obtido (piperina impura) é recristalizado com uma mistura de acetona/hexano 3:2 (100 mL; 1:5 (v/v) - aqueça o sólido com o solvente e após a dissolução filtre a mistura a quente e a solução é resfriada para precipitar. Filtre a mistura resfriada em funil de Buchner a vácuo. O sólido obtido é a Piperina Pura. Pese a piperina para cálculo do rendimento (Figura 50).

Figura 50. Fluxograma da obtenção da piperina



Questões

a) Que tipo de alcalóide é a piperina?

b) Faça um esquema da biossíntese da piperina.

c) Qual a diferença entre os componentes da pimenta preta e a pimenta malagueta?

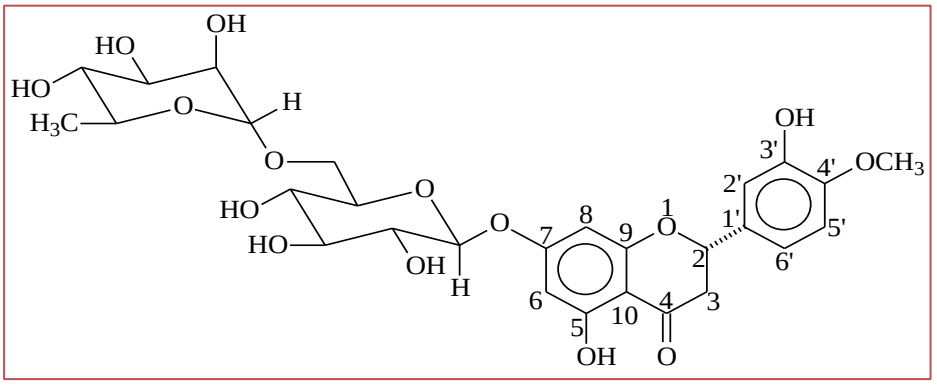
d) Pesquise sobre os constituintes do óleo essencial da pimenta preta.

e) Os principais constituintes pertencem a classe dos terpenóides ou fenilpropanóides?

EXTRAÇÃO DA HESPERIDINA DA CASCA DA LARANJA

A hesperidina é uma flavanona glicosilada extraída da parte branca da casca da laranja, encontrada também no suco da laranja, folhas e cascas do tronco de arvores cítricas. Foi isolada primeiramente por Liberton em 1828 das cascas de laranjas da família Hesperides, daí o nome hesperidina (Figura 51). Esta substância é indicada contra a fragilidade capilar.

Figura 51. Representação estrutural da Hesperidina



Dentre as técnicas citadas para a obtenção da hesperidina da casca da laranja, dois métodos são mais empregados: a) extração alcalina da casca triturada com hidróxido de sódio, seguido de acidificação do extrato e b) extração com éter de petróleo e depois com metanol, o primeiro extrai o óleo essencial e o segundo o glicosídeo. Um método mais conveniente é a extração da casca da laranja peletizada (seca), após moagem, com metanol seguido da recristalização produzindo os citroflavonóides purificados com rendimento 3% a partir da casca de laranja seca.

A) PROCEDIMENTO

OBTENÇÃO DA HESPERIDINA BRUTA

Triture a casca de laranja peletizada (Figura 52) em um desintegrador. Do material triturado pese 160,05 g em cartucho de celulose e em seguida extraia utilizando um extrator de Soxhlet de 1 litro por 24 horas com álcool metílico. Após este período retire a solução metanólica, filtre e concentre em evaporador rotativo a vácuo para produzir um resíduo xaroposo. Adicione solução de ácido acético diluído (10%) para a produção de

cristais brancos (Fig 52). Filtre o precipitado até a secagem a fim de obter um material cristalino com ponto de fusão 250-252ºC. Pese e calcule o rendimento.

B) PURIFICAÇÃO DA HESPERIDINA

Purifique os cristais dissolvendo-os em 100 mL de solução de hidróxido de sódio 10%, em seguida filtre e acidifique com ácido clorídrico diluído até pH 5,0. Filtre o precipitado formado, lave com água e seque em estufa até a produção de um de produto cristalino(Fig 52) com ponto de fusão 260-261ºC. Calcule então o rendimento.

Figura 52. Hesperidina pura obtida por extração em soxhlet: a) casca de laranja peletizada; b) Hesperidina bruta c) Hesperidina pura após acidificação e precipitação e filtração.

C) ANÁLISE DA HESPERIDINA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A hesperidina obtida é analisada por CCD em sílica gel utilizando a mistura acetato de etila: ácido fórmico: metiletilcetona: água (50 : 10: 30 : 10) produzindo um Rf 0,59, idêntico ao descrito pela literatura para a hesperidina.

D) TESTE COM $FECL_3$

Adicione solução de cloreto férrico a hesperidina e observe a produção de coloração vermelha escura.

E) TESTE DE REDUÇÃO COM HCL – MAGNÉSIO

Adicione gota a gota ácido clorídrico concentrado a uma solução etanólica de hesperidina contendo magnésio e observe a produção uma coloração violeta brilhante.

F) HIDRÓLISE ÁCIDA DA HESPERIDINA

A hidrólise da hesperidina com ácido sulfúrico em presença de etileno glicol em condições brandas fornece a aglicona, hesperidina e um mol de cada açúcar ramnose e glicose. Os açúcares são identificados por cromatografia em papel. Misture 1 g de hesperidina e 20 mL de etileno glicol contendo 1 mL de ácido sulfúrico e aqueça em banho-maria por 40 minutos. A solução amarelo-clara é vertida sobre 50 ml de água. Filtre o precipitado hesperitina em funil de buchner e lave-o com água. A recristalização com etanol forma cristais com ponto de fusão de 224-226 ^{o}C, com rendimento de 350 mg. Neutralize e concentre a vácuo o filtrado contendo açúcares até obtenção de um xarope. Identifique os açúcares por cromatografia em papel usando como eluente n-butanol- ácido acético – água, 4 : 1 : 5 (v/v). Seque o cromatograma desenvolvido para remover o solvente e em seguida pulverize com os seguintes reagentes: A) uma mistura de volumes iguais das soluções aquosas de nitrato de prata 0,1N e hidóxido de amônio 5N, B) uma mistura de 0,5 mL de anisaldeído, 9 mL de etanol (95%) e 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,1 ml de ácido acético. Coloque o cromatograma em estufa a 100^{o}C por 5 a 10 minutos para posterior revelação (Tabela 3).

Tabela 3. Rf da glicose e ramnose com as respectivas cores após derivatização.

		Cor do Reagente	
Açúcar	Rf	A	B
Glicose	0,29	Marron	Azul
Ramnose	0,48	Marron	Verde

EXTRAÇÃO DA BIXINA DO COLORAU

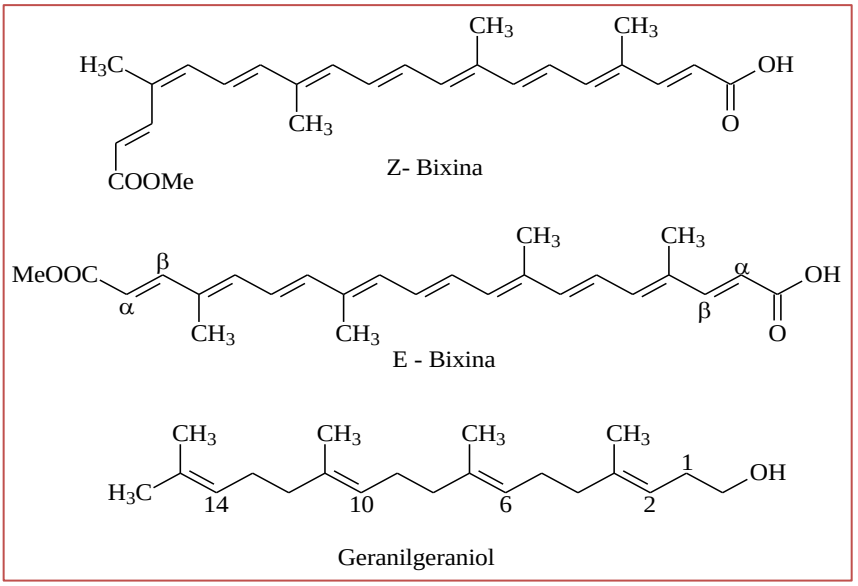
O uso de aditivos com a intenção de tornar os alimentos visualmente mais atraentes, seja na indústria alimentícia ou no uso doméstico cotidiano, é bastante comum. O corante extraído do pericarpo das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.), um arbusto nativo do Brasil e de outras regiões tropicais do planeta, recebe a denominação internacional de *annatto*, sendo largamente utilizado em várias partes do mundo em escala industrial, por conferir coloração atraente a uma extensa gama de produtos manufaturados.

No Brasil, além do amplo emprego na indústria, a preparação comercial contendo 0,20-0,25% de bixina é conhecida como colorau, componente indissociável de inúmeros

pratos da culinária brasileira. Este é produzido a partir das sementes de urucum, previamente aquecidas a 70 °C em óleo vegetal, seguido de abrasão com fubá ou farinha de mandioca ou pela mistura destas com urucum em pó, obtido por extração com solventes.

A bixina (Figura 53) possui uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, perfazendo assim a fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$. Representa 80% dos pigmentos da *Bixa orellana* L. A biossíntese da bixina se dá por clivagem dos carotenóides precursores.

Figura 53. Substâncias presentes em *Bixa orellana*



A) PROCEDIMENTO

a) Extração da bixina do colorau com base

Coloque as sementes de urucum (10 g) em um erlenmeyer de 250 mL e adicione 40 mL de uma solução de NaOH 5% e mantenha sob agitação freqüente por 5 min, para a extração da bixina. Separaram-se as sementes por filtração e adiciona-se HCl concentrado à mistura alcalina até pH 4, filtra-se usando papel de filtro previamente pesado, lava-se o sólido com água destilada até o pH neutro e seca-se o extrato em estufa a 70 ºC por 30 min.

Para verificação da presença da bixina utilize uma placa cromatográfica preparada com camada de 0,25 mm de gel de sílica 60 da Vetec. Esta placa é eluída em $CHCl_3$-MeOH (9:1). O cromatograma é observado no visível antes e após as placas serem borrifadas com solução de sulfato cérico seguido de aquecimento. Meça o Rf da bixina (COSTA & CHAVES, 2005).

CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA DE BIXINA

Dissolva cerca de 5 mg do extrato em 1 mL de H_2SO_4 concentrado para verificação da presença de carotenóides. Uma coloração azul esverdeada é indicativa da presença destes compostos.

Questões:

a) Que tipo de classe de produto natural pertence bixina e o geranil-geraniol?

b) Faça a biossíntese do geranil-geraniol

c) Qual a utilização da bixina na indústrais alimentícias e farmacêuticas?

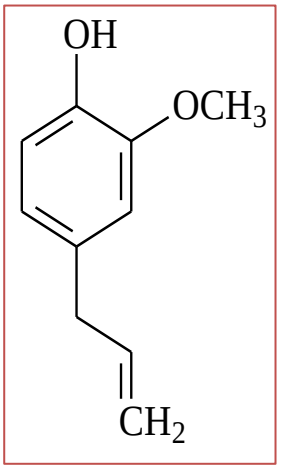
EXTRAÇÃO DA BIXINA DO COLORAU POR OUTROS MÉTODOS

A Bixina é extraída convencionalmente das sementes do urucum por meio de soluções alcalinas ou solventes orgânicos como mostrado acima. Estes métodos de extração produzem bixina de baixa pureza. Diferentes métodos de extração da bixina a partir das sementes do urucum foram efetuados. Os métodos utilizados foram: extração sequencial em leito fixo em três etapas, utilizando CO_2 supercrítico na primeira etapa, etanol na segunda e uma mistura de etanol e água (70:30 v/v) na etapa subsequente. Também foram feitas extrações controle com água e clorofórmio nas mesmas condições de pressão e temperatura. As pressões utilizadas foram 400 bar e pressão ambiente; a temperatura de extração foi de 50°C. Os melhores rendimentos de extração da bixina foram com etanol à pressão ambiente e com uma extração sequencial ($ScCO_2$ a 400 bar seguido de etanol à pressão ambiente); os extratos mais puros foram obtidos utilizando-se etanol à pressão ambiente e à 400 bar (Taham et al., 2015).

B) EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO EUGENOL

Os seguintes experimentos descrevem a extração de materiais que são disponíveis pelo seu uso em culinária. A extração do eugenol (Figura 54) consta de duas etapas, a primeira a hidrodestilação em que o óleo essencial do cravo é extraído. Este óleo é constituído principalmente pelo eugenol e beta-cariofileno. A segunda etapa é isolar o eugenol dos demais constituintes. Como o eugenol é um composto fenólico ele é solúvel em uma solução básica, desta forma o óleo essencial será lavado com solução de hidróxido de sódio e separado dos demais constituintes neutros.

Figura 54. Representação estrutural do eugenol



Cravo da Índia são botões de flores secas da planta *Eugenia aromática* nativa do sul do sudeste da Ásia, e conhecida na culinária chinesa desde 2000 anos atrás, sendo importante por inibir a putrefação da carne com a qual era cozinhada. Esta propriedade e seu forte odor são devidos a um único componente, eugenol, que constitui a maior parte do óleo de cravo, obtido pelo método de destilação por arraste com vapor d'água dos botões da flor. Outra aplicação para o eugenol inclui seu uso em preparações dentárias, perfumaria e como atraente de inseto.

PROCEDIMENTO

EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA

Pese 15 g de cravo da Índia moído, e transfira para um balão de fundo redondo de 1000 mL. Adicione cerca de 600 ml de água ao balão. Adapte o balão com a agua e cravo da Índia a um sistema de hidrodestilação, deixe o sistema sob aquecimento para a extração do óleo essencial (Figura 55) . Após a completa extração do óleo essencial separe o óleo do hidrolato (fase aquosa), e transfira o hidrolato para um funil de separação extraindo com 15 mL de diclorometano por 3 vezes. Após a separação das fases e extração, seque o diclorometano com sulfato de sódio anidro e concentre em um evaporador rotativo a vácuo para obtenção do óleo essencial de cravo. Calcule então o rendimento.

Figura 55. Sistema de Hidrodestilação tipo Clevenger

OBTENÇÃO DO EUGENOL A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO

Pese 1 g do óleo essencial de cravo da índia obtido por hidrodestilação e dissolva em 20 mL de diclorometano e transfira para um funil de separação; adicione para o funil de separação 20mL de solução de Hidróxido de Sódio 10%. Agite vigorosamente e deixe em repouso para a separação das fases. Separe a fase orgânica da alcalina e repita a extração da fase orgânica por 2 vezes com solução de hidróxido de sódio. Seque o diclorometano com sulfato de sódio anidro e concentre em um evaporador rotativo a

vácuo, o produto obtido contém as substâncias que não são solúveis em meio alcalino são denominados de neutros (cariofileno e acetato de eugenila). Calcule então o rendimento.

Reúna e acidifique as soluções de hidróxidos da extração com ácido clorídrico 6M até pH 1. A solução aquosa ácida é extraída usando 20 mL de diclorometano, a fase orgânica é separada e seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em um evaporador rotativo a vácuo produzindo o eugenol puro. Calcule então o rendimento.

ACETILAÇÃO DO EUGENOL

Pese 1,0 g do eugenol purificado e adicione a uma mistura de 15 mL de Anidrido Acético com 1,5g de Acetato de sódio em um balão de 50 mL, deixe a mistura sob refluxo por 1 hora. Após este período resfrie e transfira a mistura reacional para um bequer de 100 mL contendo 20 mL de água destilada. A mistura é neutralizada com solução de bicarbonato de sódio 5%. Transfira a mistura reacional para um funil de decantação e extraia com 20 mL de clorofórmio. Lave a fração clorofórmica com água e seque com sulfato de sódio anidro. Concentre o material em evaporador rotativo a vácuo. Calcule então o rendimento.

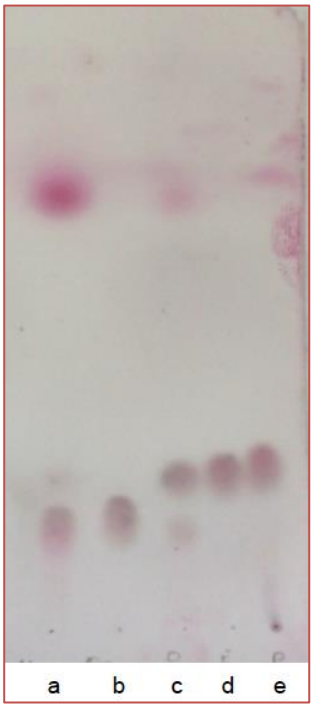
APÓS OBTENÇÃO DOS NEUTROS E DO EUGENOL

Dissolva o óleo de cravo, os neutros e o eugenol em etanol. Adicione solução de Cloreto Férrico 5%. O surgimento de uma coloração azulada nas soluções comprova a presença de fenóis livres.

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Dissolva 20 µL do eugenol em 2mL de tolueno. O mesmo processo deve ser feito com o óleo de cravo e com o acetato de eugenila (sintético e padrão) e substancias neutras (Cariofileno e acetato de eugenila). Aplique as amostras em uma cromatoplaca de sílica gel. Coloque a cromatoplaca em uma cuba cromatográfica e utilize como eluente o tolueno. Após eluição, a cromatoplaca é seca pulverizada com solução de Anisaldeído (Figura 56).

Figura 56. Cromatoplaca com: a) óleo essencial de cravo, b) eugenol, c) Sustâncias neutras, d) Acetato de Eugenila sintético e e) acetato de Eugenila padrão.



Questões sobre Eugenol

a) Por qual via biossintética o eugenol é formado?

b) Faça uma pesquisa bibliográfica e indique outras plantas que contêm eugenol.

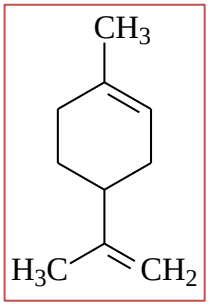
c) Apresente outras atividades do eugenol além das citadas.

d) Represente o esquema reacional da reação de extração do eugenol pela base, seguida da neutralização com o ácido.

2.3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO LIMONENO

A característica do odor dos frutos cítricos é devida a um componente chamado limoneno que é o principal constituinte. Sua obtenção fácil deve-se ao fato de que o óleo essencial de laranjas consiste de 95% de (R) limoneno (Figura 57) enquanto que a casca do limão contém o isômero (S) e também porque este composto é volátil e pode ser obtido pelo método de arraste com vapor d'água.

Figura 57. Representação estrutural do limoneno



MATERIAIS

- Cascas de laranja (~300 g)
- Solução de $KMnO_4$ 0,01M
- Solução de NaOH 6M

PROCEDIMENTO

Corte as cascas das laranjas em pequenos pedaços (~300 g) e coloque-os em um balão de fundo redondo de 500 mL. Adicione 250 mL de água ao balão contendo as cascas e monte o sistema de hidrodestilação (Figura 55). Separe o óleo, seque com sulfato de sódio e pese para calcular o rendimento. Faça o espectro no UV, IV e compare com os dados da literatura. Dissolva uma pequena quantidade do essencial obtido em CCl_4 adicione então um mesmo volume de solução de $KMnO_4$ 0,01M e alcalinizada com solução de NaOH 6M e observe a coloração resultante,

Questões:

1. Represente a reação ocorrida entre o $KMnO_4$ e o limoneno.

2. Que representa a coloração marrom na reação $KMnO_4$ e o limoneno?

3. Faça um esquema da biossíntese do limoneno.

4. Apresente outras frutas que contém limoneno.

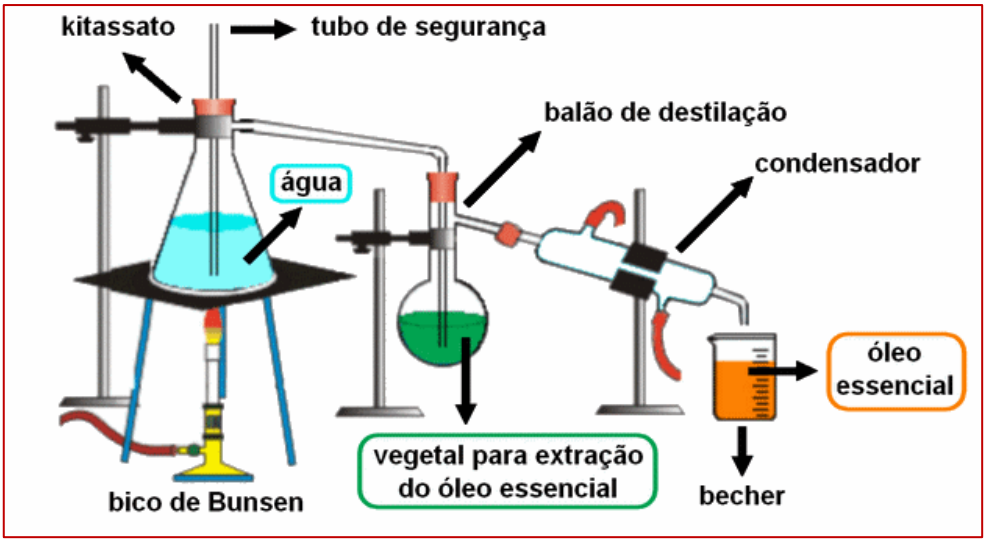
5. Pesquise as atividades biológicas do limoneno e sua biotransformação com microrganismos.

2.5. EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEPARAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES

No processo de extração de óleo essencial, podem ser aplicados diversos métodos, tais como:

- Hidrodestilação por coobação; Planta aquecida junto com água que passando para vapor arrasta o óleo essencial (Figura 55).
- Arraste com vapor d'água: O vapor é gerado fora do recipiente que contém o material a ser extraído (Figura 58).
- Maceração: Planta fica em contato por vários dias com solvente orgânico como etanol, éter e clorofórmio.
- Extração por solvente - lavagem da planta triturada com o solvente.
- Enfloração (enfleurage): Planta fica em contato com óleo vegetal (trigligerídeo)
- Gases supercríticos: óleo essencial arrastado por CO_2 supercrítico (Figura 46)
- Micro-ondas: Balão contendo a planta com água é aquecido dentro do forno de micro ondas, os vapores são recolhidos de um tubo de conexão que se extende para fora do aparelho.

Figura 58. Sistema de destilação por arraste com vapor d'água.



03 Métodos de purificação de produtos naturais

Dentre todos os métodos disponíveis para o isolamento e purificação de produtos naturais, como cristalização, partições, filtração através de membranas, a cromatografia é de longe o mais utilizado.

3.1. CROMATOGRAFIA

Introduzida pelo pesquisador russo Michael Tswett em 1906, quando separou clorofila de uma mistura de pigmentos de plantas, através de uma coluna cheia de carbonato de cálcio em pó, fazendo a lavagem com éter de petróleo. Conforme a amostra descia pela coluna, apareciam bandas separadas e cores distintas. Palavra de origem grega, onde "cromo" significa cor e "grafia" significa escrita, ou seja, "escrita em cores". Mas a cromatografia pode separar os componentes sem nenhum aparecimento de cor.

A cromatografia é um método físico-químico de separação que se fundamenta na migração diferencial dos componentes de uma mistura devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis: fase móvel (gás, líquido ou um fluido supercrítico) e fase estacionária (fixa, colocada em uma coluna ou numa superfície sólida), esta separação depende da diferença entre o comportamento dos analitos entre as fases.

A fase estacionária pode ser sólida ou líquida, quando é sólida, o mecanismo da cromatografia é baseado na adsorção das substâncias dissolvidas (cromatografia por adsorção). À medida que a solução passa através da fase sólida, os solutos vão sendo sucessivamente adsorvidos e dissolvidos, cada qual com uma característica específica. Por isso, no processo de escoamento da solução os que são mais adsorvidos atrasam-se em relação aos menos adsorvidos, e consegue-se separação uns dos outros. Quando a fase estacionária é líquida, o mecanismo da separação é baseado na diferente repartição dos solutos entre o solvente da solução e o líquido estacionário (cromatografia por repartição ou extração liquido-liquido)

Os componentes da mistura adsorvem-se com as partículas de sólido devido a interação de diversas forças intermoleculares. O composto terá uma maior ou menor adsorção, dependendo das forças de interação, que variam na seguinte ordem: formação de sais > pontes de hidrogênio > dipolo-dipolo > Van der Waals.

Princípio básico: distribuição de substâncias (compostos orgânicos) entre duas fases:

A – fase móvel: eluente

B – fase estacionária

A separação será resultante da maneira como um composto se distribui entre estas duas fases,

$$KD = \frac{[X]\ \text{fase estacionária}}{[Y]\ \text{fase móvel}}$$

Onde K_D = coeficiente de distribuição.

Os solutos (diferentes X) estarão em um equilíbrio dinâmico constante entre as duas fases. A direção do equilíbrio será determinada de acordo com a força de interação dos solutos com a fase estacionária e a "competição" da fase estacionária entre os solutos e a fase móvel.

Dependendo da natureza das duas fases envolvidas tem - se diversos tipos de cromatografia.

- A cromatografia em papel é a mais antiga e foi utilizada principalmente na análise de açúcares, sendo menos utilizada atualmente;
- A cromatografia de coluna e de camada delgada usando sílica gel, alumina ou sephadex como adsorvente são metodologias fundamentais no trabalho químico de isolamento de compostos de extratos;
- A cromatografia liquida de alta eficiência faz a análise e separação de compostos em instrumento de alta sensibilidade, fornecendo dados quantitativos precisos;

- A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas iniciou com análises de hidrocarbonetos do petróleo e atualmente é a metodologia principal para análise de óleos essenciais e lipídeos.

As técnicas de separação e purificação por cromatografia em coluna compreenderam os seguintes tipos:

A cromatografia com fase estacionária sólida, utiliza-se sílica-gel 70-230 Mesh, alumina (Al_2O_3) ou sephadex (cromatografia de coluna), e sílica-gel GF e PF (cromatografia em placa). A fase móvel é líquida e, nesse caso, são utilizados em geral os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água, separadamente ou em misturas e com sephadex usa-se apenas um solvente, mais comumente o metanol.

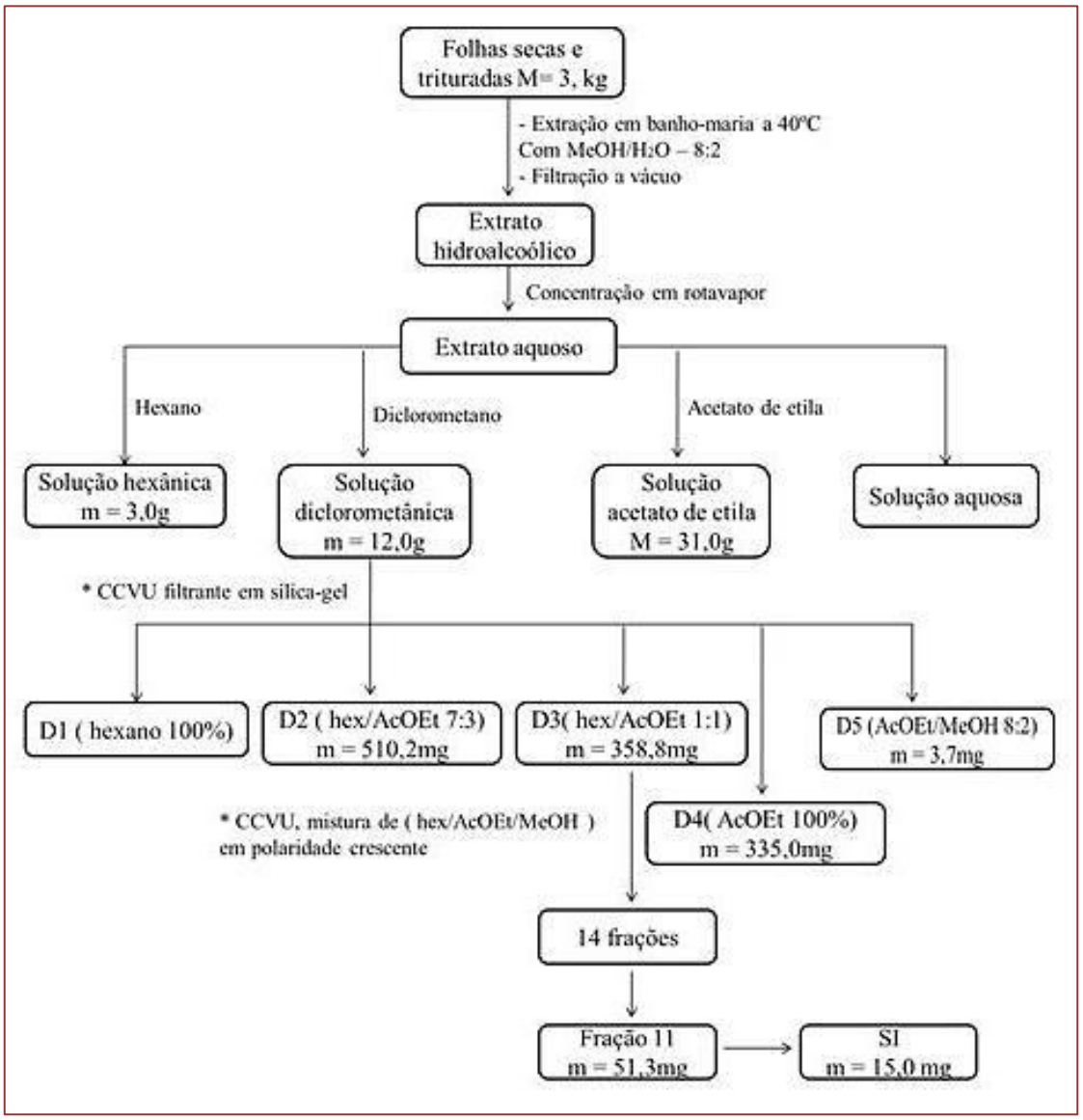
1. Coluna Cromatográfica por Via Úmida (CCVU) – é realizada em coluna de vidro, de diâmetro e altura variando em função da quantidade de amostra. A sílica-gel (fase estacionária) é colocada na coluna após ser misturada ao solvente de escolha prévia. A amostra utilizada é fracionada com misturas de solventes de polaridade crescente (fase móvel).

2. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) – utilizaram-se placas de vidro (plana) de 5 x 10 cm, preparadas com fina camada de sílica-gel 60 GF-Merck, de 0,5 mm de espessura, para monitoramento do processo de separação dos extratos e das frações.

3. Fracionamento das diferentes fases – 1. Diclorometânica – foi fracionada por CCVU filtrante, empregando-se misturas de solventes de polaridade crescente: hexano - 100% (D_1); hexano/acetato de etila - 30% (D_2); hexano/acetato de etila - 50% (D_3); acetato de etila - 100% (D_4); e acetato de etila/metanol 20% (D_5).

A seguir, a Figura 59 mostra a cromatografia em coluna onde vários solventes são utilizados em ordem diferente de polaridade para isolamento do princípio ativo alelopático de *Tachigali myrmecophyla* (tachi-preto) segundo trabalho de Souza Filho et al., 2005.

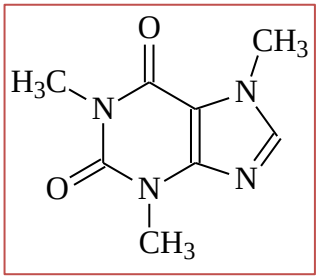
Figura 59. Fluxograma dos isolamentos e identificações de substâncias químicas com atividades alelopáticas presentes em folhas de tachi-preto.



2.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDO–LÍQUIDO DA CAFEÍNA DAS FOLHAS DO CHÁ PRETO

A cafeína é um alcalóide, um composto contendo nitrogênio, que apresenta propriedades básicas. Ela pertence a uma classe de compostos de ocorrência natural chamada xantina. Possivelmente, as xantinas são os estimulantes mais antigos conhecidos sendo que, neste contexto, a cafeína (Figura 60) é um dos mais potentes.

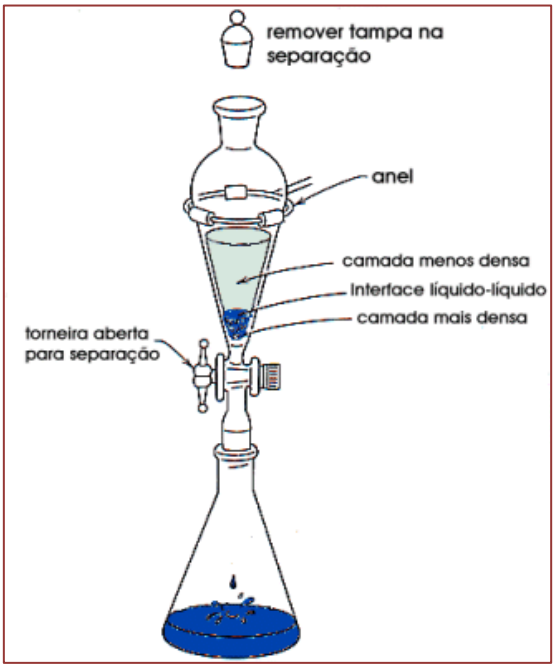
Figura 60 - Representação estrutural da cafeína



O processo de obtenção da cafeína envolve duas extrações: uma *sólido-líquido*, onde extrairemos a cafeína de folhas de plantas. E, depois, uma extração *líquido-líquido* (Figura 61), onde será extraída a cafeína da fase aquosa.

Na primeira etapa, as folhas do chá preto são extraídas com uma solução aquosa de carbonato de sódio. A solução (para a extração sólido-líquido) deve ser básica, para hidrolisar o sal cafeína-tanino, aumentando o rendimento na extração líquido-líquido.

Figura 61. Extração líquido-líquido



PROCEDIMENTO

Em um erlenmeyer pese 15,5 g de folhas de chá verde e alcalinize a solução com $NaCO_3$ até pH = 9 usando 2,66 g de $NaCO_3$. Complete o volume para 200 mL e aqueça até a ebulição por 20 minutos. Após a fervura filtre a mistura a quente em um funil simples contendo algodão. Transfira o filtrado para um funil de decantação e realize uma extração com 20 mL de diclorometano repetindo este processo por 4 vezes. Seque a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, em seguida filtre e concentre em um evaporador rotativo a vácuo. Calcule então o rendimento. Recristalize a cafeína bruta obtida por dissolução na menor quantidade possível em etanol **95%.**

Questões

1. Quais os efeitos fisiológicos da cafeína?
2. Que tipo de alcalóide é classificada a cafeína?
3. Qual a sua rota biossintética?

04 Testes fitoquímicos de caracterização e de separação de metabólitos secundários - cromatografia

Os testes fitoquímicos são feitos seguindo a metodologia proposta por Matos (2009). Para a realização dos testes fitoquímicos, 100 mg do extrato são adicionados em 100 mL de solução hidroalcoólica (etanol com 30% de água). Separam-se porções de 3-4 mL em sete tubos de ensaio e duas porções de 10 mL em béqueres deixados em banho-maria até a secura e mantidos em dessecador até a ocasião de serem usados. Abaixo uma tabela simplificada destes testes (tabela 4).

Tabela 4 – Principais testes de prospecção fitoquímica de extratos de plantas, conforme metodologia de Matos (1997)

Constituinte Químico	Reagente	Reação Positiva			Resultado
Fenóis e Taninos	Solução alcoólica de $FeCl_3$ 10%	Mudança de coloração entre azul e vermelho			Presença de Fenóis
		Precipitado escuro (azul)			Taninos hidrolisáveis
		Precipitado verde			Taninos condensados
Antocianinas	HCl / NaOH	pH 3,0	pH 8,5	pH 11,0	Resultado
		Vermelho	Lilás	Azul-purpura	Antonianinas e Antonianidinas
		-	-	Amarelo	Flavonas, Flavonóis e Xantanas
		Vermelho	-	Vermelho-purpura	Chalconas e Auronas
		-	-	Vermelho-laranja	Flavononóis
Teste de cianidina Flavonóis, Flavanonas, Flavanonóis e Xantonas	Mg / HCl	Coloração rosa para vermelho			Indicação positiva
Esteroides e Triterpenóides	Clorofórmio, Anidrido Acético, Ac. Sulfúrico concentrado	Coloração para azul, seguida de verde			Esteróides livres
		Coloração parda			Triterpenóides pentacíclico livres
Saponinas	Água e agitação	Formação de espuma persistente			Presença de saponina
Quinonas	Hidroxido de Amonio	Formação de cor vermelha na fase aquosa alcalina			Presença de quinonas, principalmente antraquinonas hidroxiladas
Alcaloides	Reagente de Dragendorff Reagente de Mayer	Formação de precipitado			Presença de Alcaloides

Na prospecção fitoquímica qualitativa, incialmente pesam-se 50,0 mg do extrato que são adicionados em 20,0 mL de etanol. Logo em seguida são separados sete porções de 2,0 mL em sete tubos de ensaio devidamente numerados e para os ensaios e mais os tubos com o branco.

TESTE PARA FENÓIS E TANINOS

No tubo de número "1" adicionam-se três gotas de solução alcoólica de $FeCl_3$. Agita-se bem e observa-se qualquer variação de cor ou formação de precipitado abundante, escuro. Comparando com um teste em branco (água e cloreto férrico).

Mudança na coloração variando entre azul e o vermelho é indicativo da presença de fenóis, quando o teste "branco" for negativo.

Aparecimento de precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e verde, a presença de taninos condensados ou catéquicos.

TESTE PARA ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONÓIDES

Pegou-se os tubos de número 2, 3 e 4, e acidulou-se um com HCl 0,1 M até pH 3,0 e alcalinizou o outro com NaOH 0,1 M até pH 8,5 e o terceiro até pH 11,0.

Observou-se qualquer mudança da coloração do material. O aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes (tabela 06).

TESTE PARA LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVANONAS

Pegou-se os tubos numerados "5" e "6" e acidulou-se o primeiro com adição de HCl 0,1 M até pH 1,0 à 3,0 e alcalinizou-se o outro com NaOH 0,1 M até pH 11,0. Aqueceu-se os tubos com auxílio de uma lâmpada de álcool durante 2 minutos, cuidadosamente.

Observou-se qualquer modificação na cor, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior.

O aparecimento ou intensificação de cor indica a presença de constituintes específicos.

TESTE PARA FLAVONÓIS, FLAVANONAS, FLAVANONÓIS E XANTONAS

Adicionou-se ao tubo de número "7" alguns centigramas de magnésio em fita e 1,0 mL de HCl concentrado. Aguardou-se o término da reação indicada pelo fim da efervescência e

observou-se por comparação a mudança na cor da mistura da reação nos tubos “5” e “7” (acidificados).

O aparecimento ou intensificação da cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídios.

TESTE PARA ESTEROIDES E TRITERPENÓIDES (LIEBERMAN-BURCHARD)

Alguns miligramas de extrato seco (~50 mg) diluiu-se em 2,0 mL de clorofórmio, tendo cuidado de triturar bem o resíduo com o solvente, em seguida filtra-se a solução clorofórmica gota a gota em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com alguns decigramas de Na_2SO_4 anidro, para o tubo de ensaio número "8". Adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético ao tubo e agitou-se suavemente, logo em seguida juntou-se cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado e tornou-se a agitar suavemente novamente. Observou-se se houve rápido desenvolvimento de cores.

A coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteroides livres. Já a coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentaciclicos livres.

TESTE PARA SAPONINAS

Alguns miligramas de extrato seco (~50 mg) são adicionadas a 2,0 mL de água no tubo número "9" e agita-se a solução fortemente por 2 minutos. Espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas (heterosídes saponínicos).

TESTE PARA ALCALOIDES

Alguns miligramas de extrato seco (~50 mg) são adicionadas a dois tubos de ensaio "10" e "11" logo em seguida acidifica-se os dois tubos com 1,0 mL de HCl 0,1 M e adiciona-se 3 gotas do reagente Mayer no tubo "10" e 3 gotas do reagente Dragendorff no tubo "11".

Observou-se se houve a formação de precipitado floculoso em um dos dois tubos, indicando a presença de alcaloides.

TESTES PARA CATEQUINAS

Uma alíquota de 3 mL do extrato etanólico foi acrescido com 1 mL de solução aquosa de vanilina 1% e mais 1 mL de HCl P.A. Ocorre mudança de coloração com formação de precipitado confirma presença de catequinas.

TESTE PARA CUMARINAS

Em uma fita de papel filtro de 3 x 5 cm pinga-se 3 gotas do extrato concentrado, para formar duas manchas com aproximadamente 1,5 cm de diâmetro cada. A mancha 1 será o controle e na mancha 2 adicione 1 gota de solução de NaOH 10% (m/v) e deixe a temperatura ambiente até secar. leve a fita para câmara com luz ultravioleta e observe por 2-3 minutos. A presença de coloração amarela ou verde indica compostos cumarínicos no extrato.

TESTE PARA QUINONAS

Em um tubo de ensaio adiciona-se 2 g de extrato e 4 mL de éter etílico (clorofórmio), ou o suficiente para cobrir amostra, agita-se a solução por 2 minutos e filtra-se para outro tubo de ensaio utilizando-se algodão. Ao novo tubo de ensaio adiciona-se 1 mL de solução de NaOH (10 % em água). O desenvolvimento de coloração rósea-avermelhada indica resultado positivo.

TESTE PARA PURINAS

Em uma cápsula de porcelana, foi adicionado 3 mL do extrato etanólico, com 3 gotas de uma solução aquosa de HCl (2 M) e duas gotas de H_2O_2 30% (v/v). A solução foi levada para evaporação em estufa com circulação e renovação de ar forçada a 90 ± 1,0 °C. Após este processo, a formação de coloração avermelhada como resíduo foi acrescido com 3 gotas de uma solução aquosa de NH_4OH 6N (m/v). A coloração em tom violeta indica a presença positiva para purinas.

TESTE PARA POLISSACARÍDEO (CARBOIDRATO)

Adicione 3 mg de extrato seco em um tubo de ensaio e dissolva em 5mL de água destilada. Após a dissolução total, filtre a solução para outro tubo e adicione 3 gotas de

Lugol (solução de iodo). A coloração azul ou roxa indica a presença de cadeias polissacarídicas nos extratos.

TESTES FITOQUÍMICOS QUALITATIVOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

O teste fitoquímico realizado por Wagner & Bladt (1996) para a detecção de ácidos graxos, alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides e terpenoides é descrito a seguir:

Com o auxílio de tubos capilares de vidro, os extratos foram aplicados na origem de cinco cromatoplacas de sílica-gel (ALUMINUM BACKED TLC, SILICA GEL, HARD LAYER, F-254, SAI) de dimensões 5 x 6 cm, formando manchas semelhantes e regulares. Três placas foram eluídas com mistura de solvente polar ácido (acetato de etila: ácido fórmico: água 88:6:6). Uma placa foi eluída com mistura de solvente polar básico (tolueno: acetato de etila: dietilamina 70:20:10) e uma com eluente apolar (tolueno: acetato de etila 93:7). Após eluição, as placas foram secas e observadas sob luz de ultravioleta (UV), sendo registrados os resultados.

Visando evidenciar as principais classes de substâncias químicas presentes nos extratos retirados de diferentes partes da planta *Senna alata*, foram utilizados os seguintes reagentes (Wagner & Bladt, 1996; Gianvechio et al., 2006; Maciel et al., 2006), para pulverização:

- DRAG (Reativo de Dragendorff) ou ácido sulfúrico 10%, aplicados sobre a cromatoplaca eluída no sistema polar básico para a detecção de alcaloides (coloração amarronzada).
- NP/PEG (difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol), aplicado sobre cromatoplaca eluída no sistema polar ácido para a detecção de cumarinas (azul-verde) e flavonoides (amarelo, laranja) sobre luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm.
- KOH (hidróxido de potássio), aplicado sobre cromatoplaca eluída no sistema polar ácido para a detecção de antraquinonas (vermelho-amarelo) e cumarinas (azul-verde) sobre luz UV 365 nm.

- VAS (vanilina sulfúrica ácida), aplicada sobre cromatoplaca eluída no sistema polar ácido para a detecção de terpenoides (amarelo-marrom) e ácidos graxos (azul).

Os aspectos considerados da mancha da substância analisada foram a cor e altura antes e após exame com luz UV e mudanças de coloração com o uso de reveladores.

- Cor: dependendo da tonalidade predominante, a cor da imagem em conjunto se define como vivamente colorida, pouco colorida ou muito pouco colorida.
- Mudanças de coloração: a imagem capilar foi exposta a reagentes sobre ela gotejados ou borrifados, e as mudanças de coloração foram observadas e registradas.
- Exame com luz ultravioleta: depois da corrida, a cromatoplaca é exposta à luz UV 365 nm. Foram observadas e registradas as fluorescências das diferentes zonas da imagem e suas intensidades.

4.1 SEPARAÇÃO DOS PIGMENTOS DE FOLHAS DE PLANTAS POR CROMATOGRAFIA EM PAPEL

A cromatografia é uma técnica experimental largamente utilizada pela qual uma mistura de compostos pode ser separada nos seus componentes individuais. A cromatografia em papel realiza uma análise qualitativa da mistura.

A cromatografia em papel (CP) é uma técnica de partição líquido–líquido, estando um deles fixado a um suporte sólido. O papel absorve água da atmosfera que constitui a fase estacionária. O solvente que sobe por capilaridade no papel é a fase móvel (eluente) e carrega com ele os componentes da mistura que atingem posições no papel de acordo com suas polaridades e solubilidades entre o eluente e fase estacionária. Os mais polares ficam na parte inferior e os menos polares são mais arrastados pelo eluente e sobem mais no papel cromatográfico. Este método, embora menos eficiente que a CCD (cromatografia em camada delgada), é muito útil para a separação de compostos polares, sendo largamente usado em bioquímica. A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido–sólido. Nesse caso, a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária.

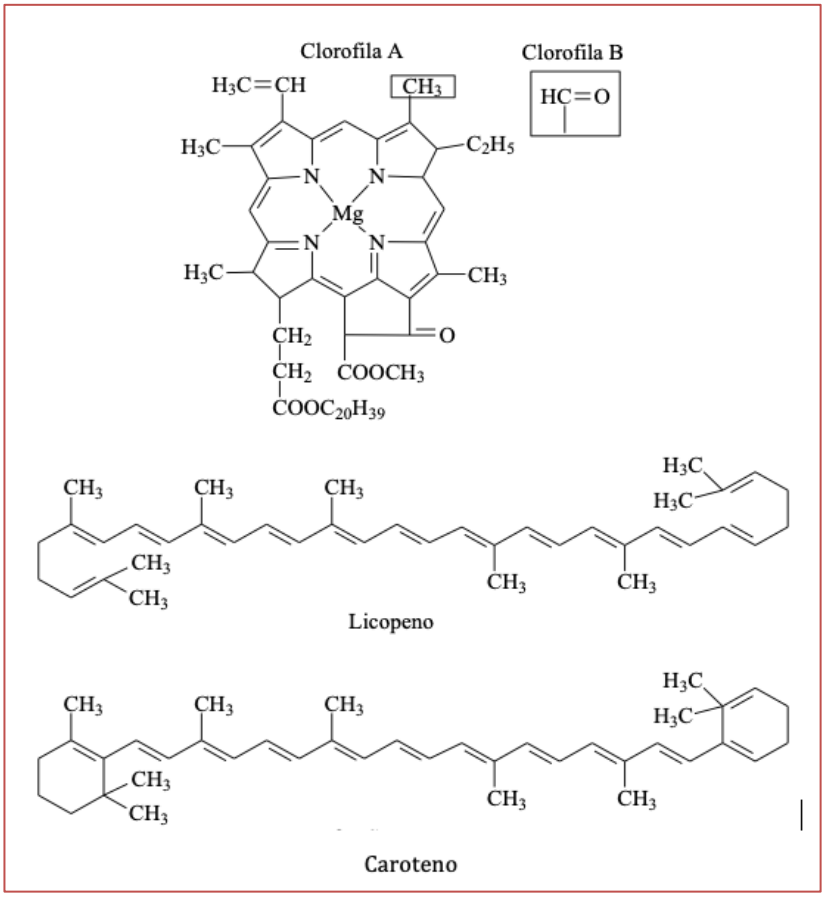
Nesta prática o extrato de espinafre será examinado por cromatografia em papel para verificar a separação dos seus principais pigmentos. O extrato de espinafre apresenta

principalmente componentes como: β-caroteno (alaranjado), clorofilas a e b (esverdeadas). No extrato de tomate por exemplo podem ser encontrados principalmente β-caroteno e licopeno (Figura 62).

As cores desses pigmentos são devidas as numerosas ligações duplas conjugadas e/ou sistemas aromáticos em suas estruturas.

$$R_F = \frac{Distância\ percorrida\ pela\ amostra}{Distância\ percorrida\ pelo\ solvente\ a\ partir\ da\ origem}$$

Figura 62. Pigmentos comuns em plantas



PROCEDIMENTO

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

1ª etapa: Extração dos pigmentos das folhas de espinafre

Mergulhe cerca de 1g de tecido de folhas frescas de espinafre durante alguns minutos em água fervente para desnaturar as proteínas das células e facilitar a liberação dos pigmentos para o solvente.

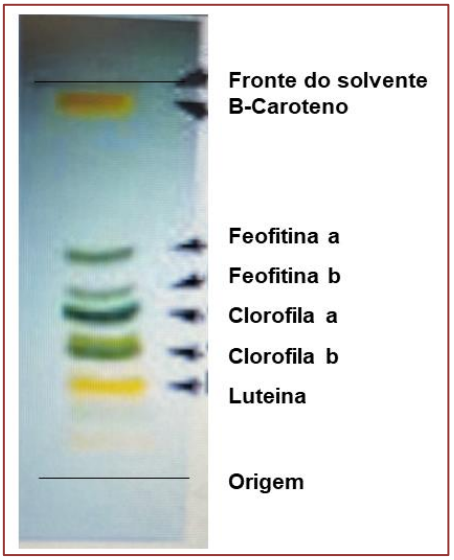
Retire o material foliar e absorva o excesso de água com papel absorvente.

Triture em um almofariz usando 5 mL da solução éter de petróleo/ álcool metílico 50:1.

2ª etapa: Desenvolvimento da cromatografia dos pigmentos extraídos.

- Prepare o papel de cromatografia, utilizando um papel de filtro, recorte-o em forma de retângulo; depois, traceje com lápis uma linha reta próximo a cada extremidade.
- Mergulhe um tubo capilar na solução dos pigmentos e pingue sobre a parte média de uma das retas marcadas no papel de filtro (origem).
- Introduza o papel no béquer contendo o solvente (éter de petróleo/ álcool metílico 50:1) e deixe eluir até atingir a fronte.
- Quando o solvente atingir a linha da fronte, retira-se o papel de dentro do béquer.
- Observe a separação dos pigmentos na figura 63 do extrato do espinafre em cromatografia de camada delgada.

Figura 63. Cromatografia em camada delgada dos pigmentos do espinafre



Questões

1. Fale sobre cromatografia fazendo uma comparação entre três técnicas: cromatografia em camada delgada; Cromatografia em papel e Cromatografia em coluna.

2. (a) O que é a fase estacionária numa coluna cromatográfica?

   (b) O que é a fase móvel?

3. Pesquise a estrutura das clorofilas e dos carotenos e justifique a cor observada por essas substâncias.

4. Qual o mecanismo de separação na cromatografia em papel?

5. Calcule os RFs de cada pigmento do espinafre na figura 63.

6. Em relação à estruturas de um dos principais pigmentos do extrato de espinafre: β-caroteno, responda:

(a) Estes pigmentos são hidrocarbonetos?

(b) Qual o grupo funcional presente nestes pigmentos?

(c) Que tipo de solventes serão bons para solubilizar estes pigmentos: polar ou apolar?

4.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A análise qualitativa e quantitativa de flavonóides comuns em extratos polares de plantas como por exemplo rutina, isoquercitrina, quercetina, catequinas e canferol pode ser realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou em inglês High Performance Liquid Chromatography (HPLC), utilizando-se de padrões destas substâncias. Nesta técnica utiliza-se em geral um detector de ultravioleta. A figura 64 mostra o cromatograma da mistura de flavonóides presentes na fava d'Anta (*Dimophandra gardneriana*), comum na região do Cariri, sul do estado do Ceará.

A rutina, 3-O-rutinosídeo da quercetina, é largamente utilizada em fitoterápicos para fragilidade capilar prevenindo varizes e derrames de retina. Isoquercitrina (3-*O*-glicosídeo de quercetina) apresenta atividade antiinflamatória em colite experimental, associada com ação antioxidante e melhoramento da absorção de água in vivo (HOBBS et al., 2018). Quercetina, o principal flavonóide presente em vegetais e frutas, exerce

potenciais efeitos anticarcinogênicos em modelos de animais e culturas de células (Salucci, 2002). As estruturas dos compostos estão apresentadas na figura 65.

Figura 64. Cromatograma de CLAE dos principais constituintes de extratos da fava d'Anta. Coluna: Waters C18 (150 x 3.9 mm, 4 µm; eluente: água / Acetonitrila / ácidofosfórico / 80:20), Fluxo: 1mL/min, 20 µl, Temperatura: 21ºC. Detecção: 350 nm.

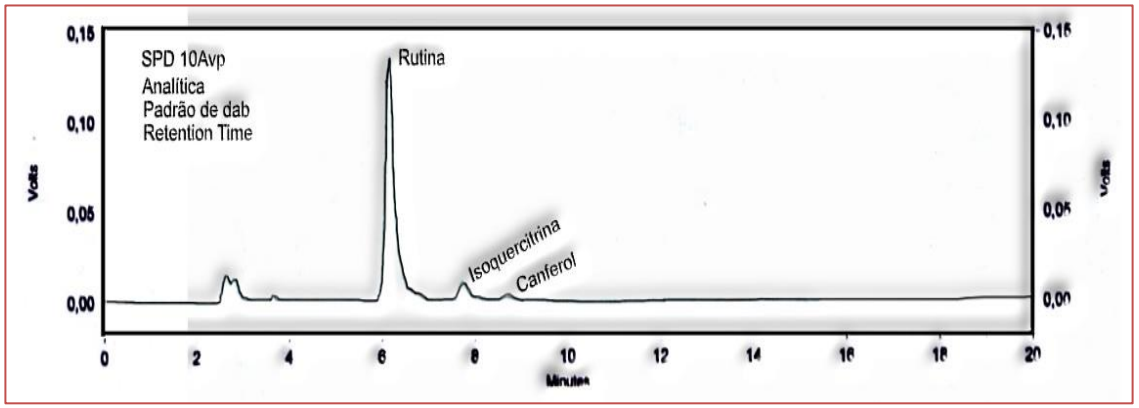
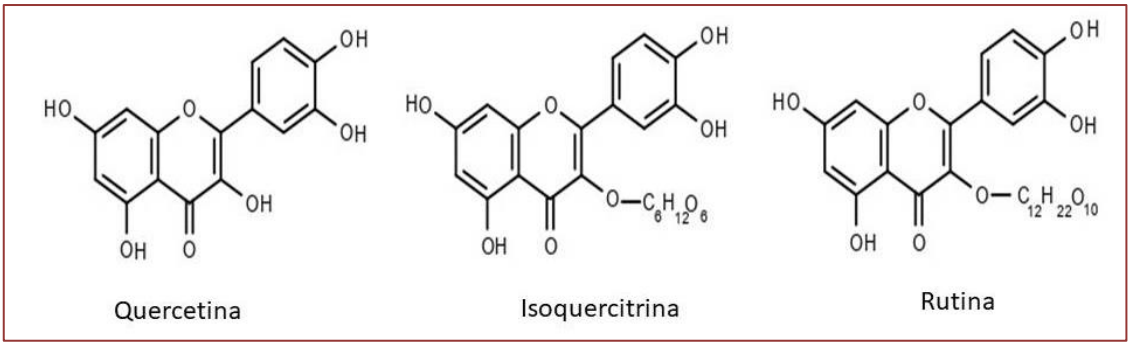


Figura 65. Representação estrutural de flavonoides presentes em fava d'Anta (*Dimophandra gardneriana*)



MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE FLAVONOIDES (COMPOSTOS FENÓLICOS)

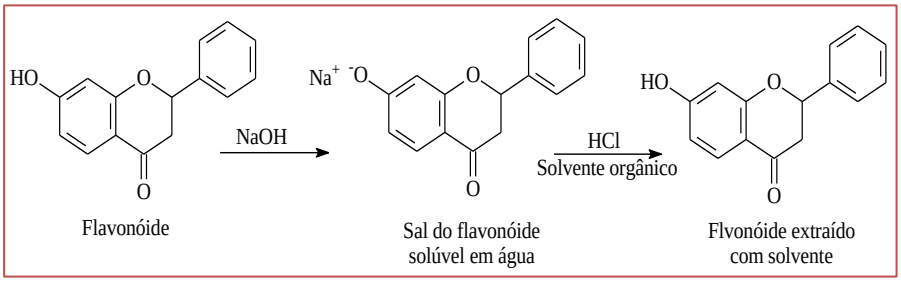
POR MARCHA QUÍMICA: Esquema Na Figura 66

1. obtenção do extrato hidroalcoólico
2. adição de solução alcalina de NaOH 5%
3. separação da solução alcalina por filtração
4. acidificação da solução alcalina com HCl 5%
5. extração com solventes orgânicos
6. evaporação dos solventes
7. pesagem dos flavonóides totais

MECANISMO DA EXTRAÇÃO

A Figura 66 mostra as reações químicas ocorridas em meio ácido e meio básico com os flavonoides envolvendo grupamento fenólico presente na molécula.

Figura 66. Esquema reacional de flavonoides em meio básico e ácido



POR PARTIÇÃO

a. obtenção do extrato alcoólico da planta

b. adição de água

c. extração com os solventes: clorofórmio (flavonoides metilados), acetato de etila (flavonóides com hidroxilas) e butanol (glicosídeos de flavonóides e taninos)

d. evaporação do solvente

e. pesagem dos compostos totais

EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES (BASES NITROGENADAS)

1: Colocar o material vegetal em pó em água acidificada (pH 2) e aquecer até cerca de 50 ^{o}C durante 24 horas, mantendo a mistura sob agitação.

2: filtrar a solução. Os alcalóides devem ficar no filtrado.

3. Dependendo do material vegetal usado pode ser necessário remover a gordura (remover clorofila e outras produtos indesejáveis). Para fazer isso adicionar um solvente orgânico não polar (clorofórmio, éter, etc) ao filtrado e misture bem. Deixe por 24 horas. Todas as gorduras e outros produtos não desejados devem migrar para o solvente. Separar o solvente e descartar (repetir este processo três vezes).

4: Adicionar uma forte solução alcalina (pH 10-13), gota a gota `a solução desengordurada.

5: Adicionar solvente orgânico não polar em temperatura amena, manter quente (60 ºC) e mexer delicadamente por 20 minutos. Os alcalóides vão migrar para o solvente não polar. Deixar a solução durante 24 horas. Uma emulsão espessa pode ter se formado. Para quebrá-la adicionar mais solução alcalina (NaOH). Separar a camada de solvente orgânico da solução alcalina aquosa.

6: Evapora-se o solvente. Obtém-se os alcaloides, na forma de base livre, que variam em cor e textura dependendo de quão bem você fez a extração.

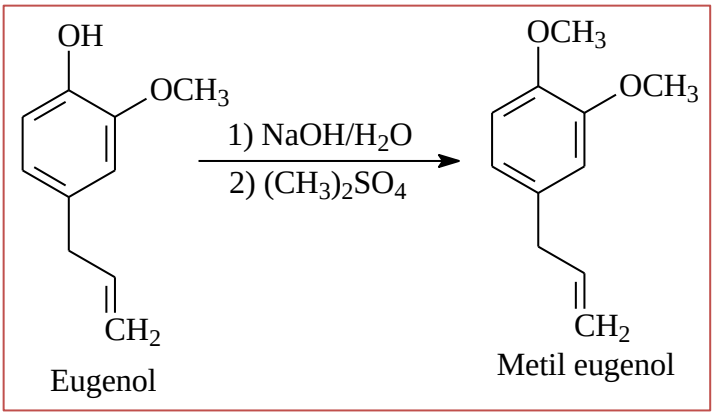
05 Preparação de derivados (metilação, acetilação e hidrólise)

As reações de preparação de derivados são utilizadas para os mais diversos fins como para melhor separação cromatográfica tanto em colunas abertas como em colunas de cromatógrafo. Como exemplo do primeiro caso, a metilação e a acetilação diminuem a polaridade dos compostos hidrofílicos e facilitam sua dissolução em solventes orgânicos. Os óleos e gorduras são em geral metilados para a sua análise por cromatografia de gás acoplada a espectrometria de massas. Já a hidrólise de glicosídeos separa a aglicona do açúcar e facilita sua solubilidade nos solventes orgânicos.

Estas reações também são usadas em estudos de atividades biológicas em que as modificações ocorridas com as moléculas proporcionam em geral mudanças nestas atividades, gerando novas possibilidades de ação.

5.1 METILAÇÃO COM SULFATO DE DIMETILA EM MEIO ALCALINO - REAÇÃO DE METILAÇÃO DO EUGENOL (FIGURA 67)

Figura 67. Esquema reacional da reação de metilação do eugenol

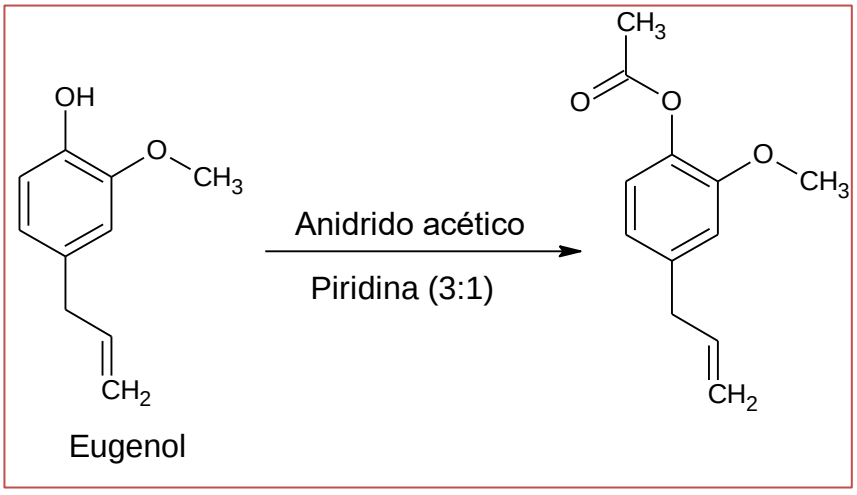


PREPARAÇÃO DO 4-ALIL-1,2-DIMETÓXI-BENZENO (O-METIL-EUGENOL).

Prepare uma suspenção com eugenol (8,2 g, 0,05 moles) em uma solução gelada de NaOH (13,3 g, 0,33 moles) em água (81,25 mL) com vigorosa agitação. Adicione de uma só vez, sulfato de dimetila (14,4g, 11,13 mL, 0,12 moles) e deixe misturar vigorosamente por 20 minutos, mantendo a temperatura externa menor que 35°C. Adicione uma segunda porção de sulfato de dimetila (14,4 g, 11,13 mL, 0,12 moles), após isto deixe a temperatura elevar até 40-45°C. Ao término da reação, transfira a mistura reacional para um funil de decantação. A camada orgânica, que contém o O-metil-eugenol, deve ser lavada com água destilada e secada com sulfato de sódio anidro, obtendo-se o metil-eugenol puro (Furniss *et al.*, 1989).

5.2 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DO EUGENOL (FIGURA 68)

Figura 68. Esquema da reação de acetilação do eugenol



PREPARAÇÃO DO ACETIL-4-ALIL-2-METOXI-FENOL (ACETATO DE EUGENILA) (4).

Acrescente a 6 g de Eugenol uma mistura de 12 g de anidrido acético e 4g de piridina. Deixe a mistura sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente. Após esse tempo transfira para um becker e acrescente 20 mL de água destilada gelada. Neutralize a solução por adição de HCl 5%. Transfira a mistura reacional para um funil de separação e realize a extração com três porções de 20 mL de clorofórmio. Lave a camada do

clorofórmio, contendo o material acetilado (*O*-acetil-eugenol), por cinco vezes utilizando água (20 mL). Seque com sulfato de sódio anidro e evapore o solvente (Furniss *et al.*, 1989).

OUTRA METODOLOGIA DE ACETILAÇÃO.

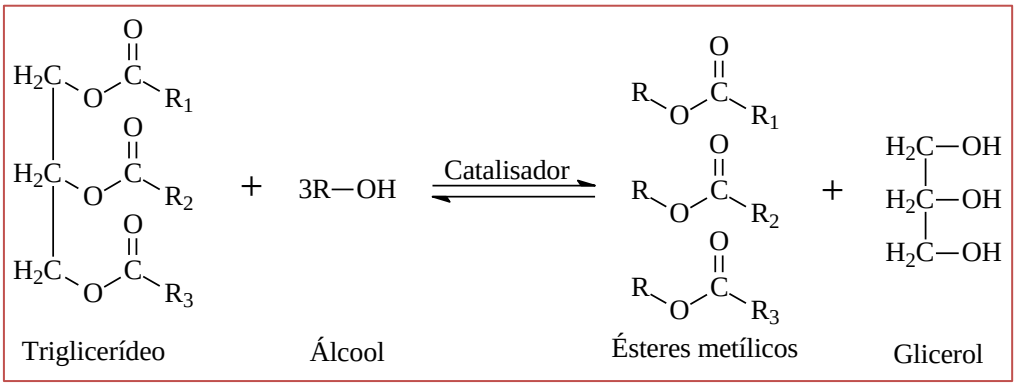
Uma mistura de anidrido acético e piridina é preparada na proporção 2:1, depois adiciona-se o eugenol à mistura reacional e deixa-se em agitação durante 24 h à temperatura ambiente. Após este período, acrescenta-se clorofórmio a mistura reacional e lava-se várias vezes com solução saturada de $CuSO_4$ até a eliminação de toda a piridina, segue-se com lavagens com água destilada, tratamento com sulfato de sódio anidro e evaporação do solvente num evaporador rotativo (Almeida et al., 2010).

Obs.: A solução de sulfato de cobre tem cor azul turquesa e sua mistura com a piridina adquire uma coloração azul anil.

5.3. REAÇÃO DE TRANSMETILAÇÃO DE ÓLEOS E GORDURAS

A análise de óleos e gorduras é feita por CG/EM e para tanto sofre o processo de transmetilação (Figura 69) que separa os ácidos graxos dos triglicerídeos e torna-os mais voláteis para injeção e separação no cromatógrafo e análise por espectrometria de massas.

Figura 69. Esquema reacional de preparação de biodiesel por transmetilação em meio básico



Colete em um erlenmeyer 2,4 g de óleo. Adicione 20 mL de hexano e 20 mL de solução metanólica de hidróxido potássio 20%. Coloque em banho-maria a 60ºC por 3 horas e adicione 20 mL de hexano e solução de ácido clorídrico 5% o suficiente para obter um pH ácido (=1). Após a acidificação, transfira a mistura para um funil de decantação, espere a separação das fases e descarte a fase aquosa. Lave a fase hexânica com agua destilada (2x 20 mL), separe a fase hexânica e concentre em evaporador rotativo a vácuo e pese (~2 g)

REAÇÃO DE PREPARAÇÃO DE BIODIESEL POR TRANSMETILAÇÃO EM MEIO ÁCIDO

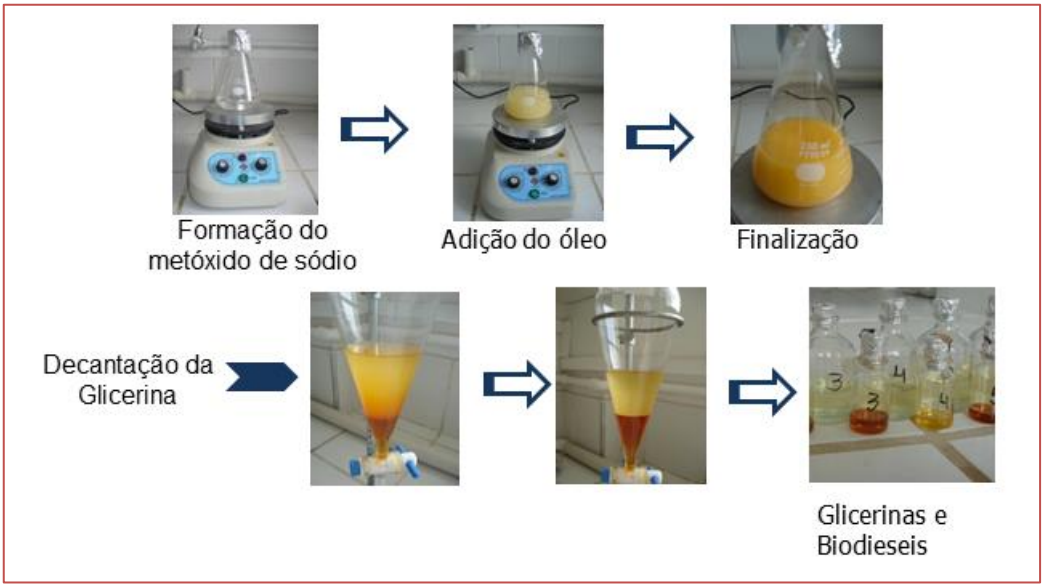
Colete 0,5 g de óleo vegetal em um balão de fundo redondo e adicione 50 mL de Metanol e 4 gotas de H_2SO_4 e Colocou-se para refluxar (4 horas). Em seguida, coloque para concentrar no evaporador rotativo a vácuo, adicione 20 mL de hexano, 20 mL de H_2O e transfira para o funil de separação, espere a formação de duas fases. Separe a fase hexanica e lave com 15 mL de Na_2CO_3 20% e em seguida com 10 mL de H_2O. Decante e separe a fase hexânica. Em seguida seque com um pouco de Na_2SO_4 anidro, filtre e concentre em evaporador rotativo a vácuo (0,4 g).

PURIFICAÇÃO DOS ÉSTERES METILICOS (BIODIESEL)

As técnicas experimentais estão mostradas na figura 70.

Adicione 50 mL de água quente ao funil para lavar os ésteres agitando com muito cuidado. Remova a água que deve estar turva repitindo esta operação de lavagem por 3 vezes aumentado a agitação até que a água esteja transparente. Aquecer a fase superior em chapa aquecedora a 110 ^oC para a secagem dos ésteres metílicos (biodiesel). Pese a quantidade de biodiesel obtido e calcule o rendimento em massa de biodiesel.

Figura 70. Etapas de preparação do biodiesel



CONFIRMAÇÃO DA PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES METÍLICOS (BIODIESEL) POR CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Recorte um papel de filtro formando um retângulo (5 cm x 3 cm). Trace com um lápis duas linhas distando das extremidades 0,5 cm. Aplique com um auxílio de um capilar o biodiesel e o óleo vegetal na linha de origem do papel como se observa na figura 41. Em um vidro pequeno de café solúvel coloque 5 mL de éter de petróleo ou hexano. Deposite o papel de filtro no interior do vidro e coloque a tampa para impedir que o solvente evapore. Deixe o solvente eluir no papel até a linha de frente marcada. Retire o papel e deixe secar a temperatura ambiente. Coloque para revelar em uma cuba de iodo, preparada utilizando-se outro vidro de café solúvel (cuba de eluição) contendo algumas gramas de iodo em pó. Deixe por 5 minutos até as manchas aparecerem e calcule o Rf de cada mancha.

06 Quantificação de produtos naturais (fenóis totais, taninos, flavonóides, etc) por cromatografia em camada delgada / cromatografia liquida de alta eficiência

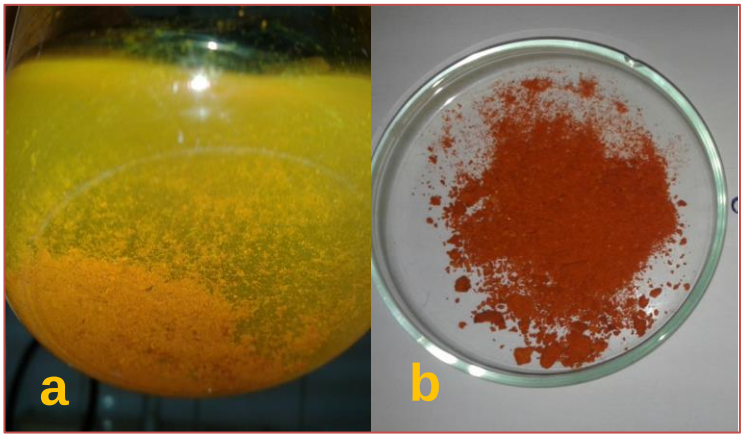
6.1. QUANTIFICAÇÃO POR CLAE DOS CURCUMINÓIDES DE *Curcuma Longa* (AÇAFRÃO)

A *Curcuma longa*, conhecido também como açafrão-da-terra, turmérico, açafrão-da-índia, açafroa e gengibre amarelo, é uma planta herbácea da família do gengibre (Zingiberaceae), originária da Ásia (Índia e Indonésia). Dela se obtém uma especiaria homônima que é o principal componente do tempero do caril (prato culinário) à indiana (ou curry). Sua característica principal é atuar como digestivo e ativador da função hepática. Da sua raiz seca e moída se extrai o pó, conhecido simplesmente por açafrão, utilizado como condimento ou corante de cor amarela e brilhante, na culinária e no preparo de medicamentos.

Extração da Curcumina:

Para 20g da amostra (açafrão), adicione 50 mL de diclorometano, aqueça a mistura até a ebulição usando chapa aquecedora. Após 15 minutos filtre a mistura em funil simples, realizando esta operação por mais 3 vezes, em seguida filtre novamente o extrato obtido. Evapore o filtrado utilizando um sistema com fluxo constante de ar comprimido até completa secagem do solvente (Oleoresina, figura 71). Adicione ao resíduo da secagem 50 mL de hexano e macere até a obtenção de um pó fino. Após a maceração separe o sólido por filtração e seque-o para posterior pesagem (Extrato bruto com curcuminoides, Figura 71). Calcule então o rendimento.

Figura 71: Extração dos curcuminoides do açafrão: a) Oleoresina do açafrão b) extrato bruto dos pigmentos curcuminóides.



COLUNA CROMATOGRÁFICA PARA SEPARAÇÃO DOS TRÊS CONSTITUINTES DO AÇAFRÃO.

Submeta as amostras à cromatografia em coluna utilizando 30 g de sílica gel (60-230 mesh), monte a coluna utilizando como eluente uma mistura de solventes contendo 1% metanol – 99% diclorometano. Dissolva cerca de 0,4 g do extrato em pequena quantidade de diclorometano, misture com 1 g de sílica e adicione à coluna. Elua a coluna contendo a amostra com 1% metanol – 99% diclorometano. Todas as frações coletadas são submetidas à TLC Sílica gel 60 F254 utilizando diclorometano:metanol (95:5) como fase móvel. As frações que apresentam Rf's similares devem ser reunidas e evaporadas (Figura 72). A figura 73 mostra a representação das estruturas dos três principais curcuminoides presentes na no óleo- resina do açafrão.

Figura 72: CCD do Extrato extrato bruto dos pigmentos curcuminóides do açafrão

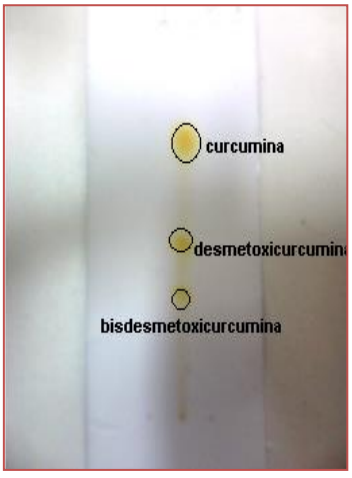
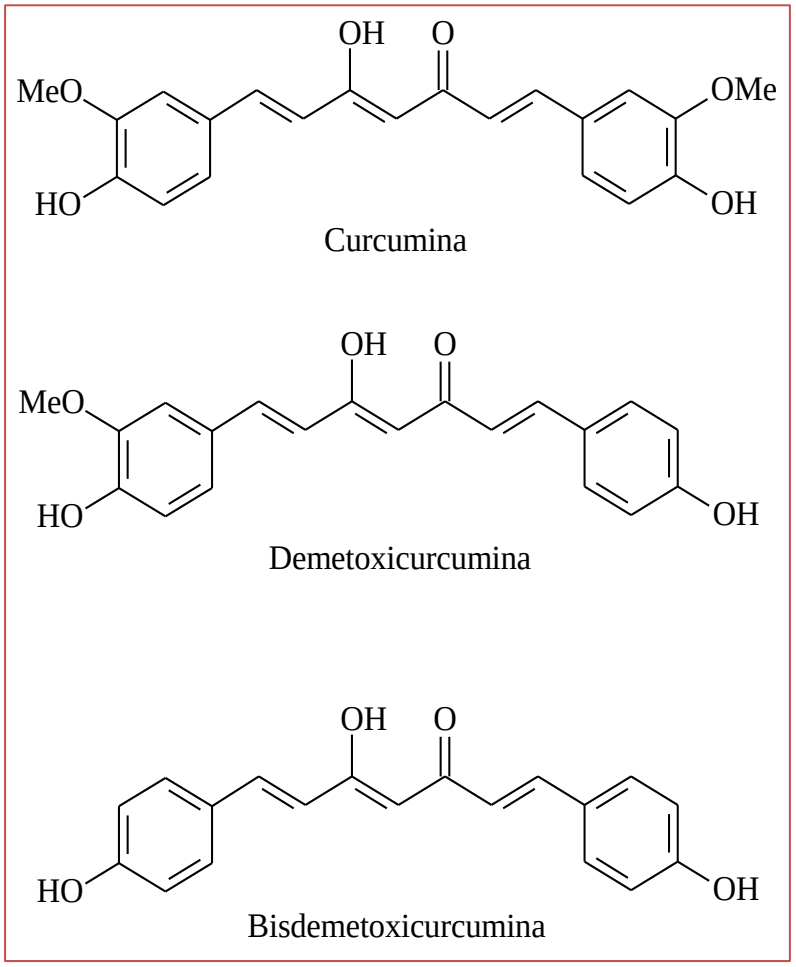


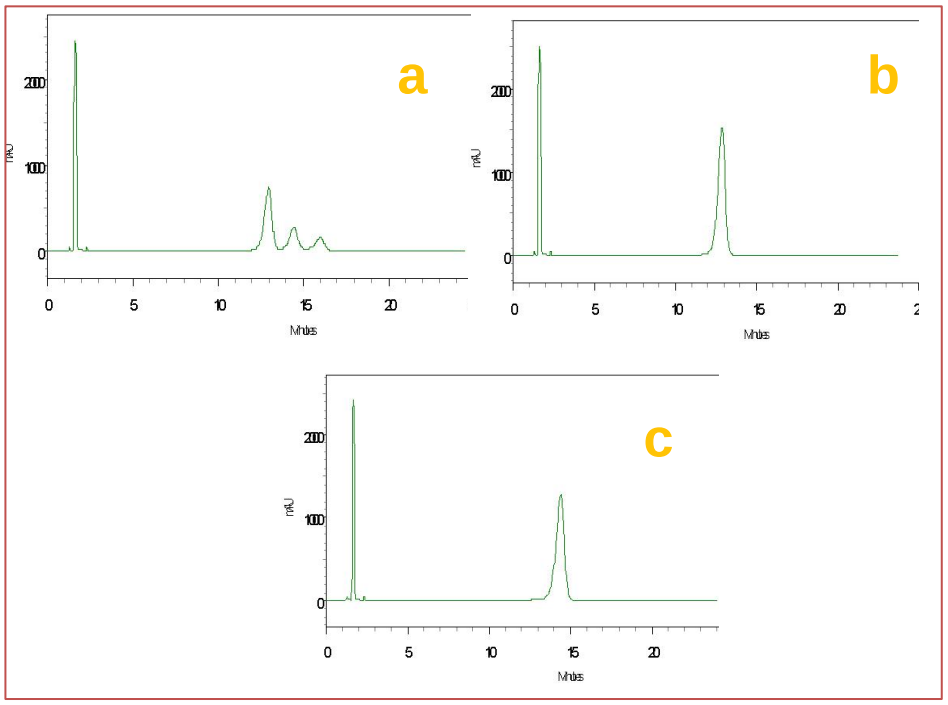
Figura 73. Representação estrutural dos principais curcuminoides do açafrão



ANÁLISE POR HPLC DOS CURCUMINÓIDES DE *Curcuma Longa* (FIGURA 74)

FASE MÓVEL: 40% THF e 60% ácido cítrico 1% - pH= 3,04 ajustados com KOH. Vazão: 1 ml/min; Comprimento de onda: 420 nm; Temperatura do forno: ambiente; Solubilidade: acetona; Tempo de corrida: 22,5 minutos; Coluna: shim- pack clc (m) – ods 15 cm com pré-coluna; Pré-coluna: presente; Bombeamento: modo isocrático: Preparacao das amostras: 0,5 mg/mL em acetona.

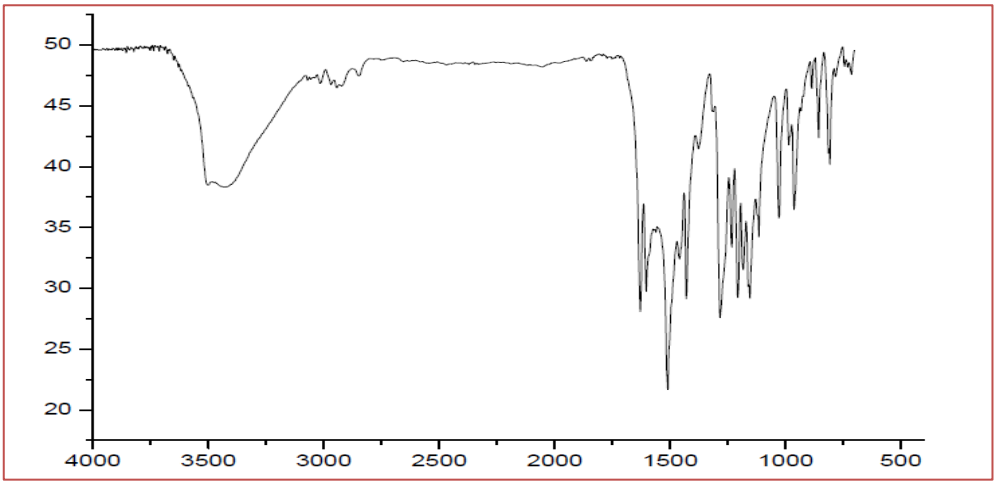
Figura 74. Cromatogramas obtidos por cromatografia liquida de alta eficiência de: a) Extrato do extrato bruto dos pigmentos curcuminóides do açafrão, a) Curcumina, b) Demetoxicurcumina, c) Bisdemetoxicurcumina.



ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DA CURCUMINA

O espectro no infravermelho da curcumina (Figura 75) mostra as seguintes atribuições: a presença de fenol é sugerida pelas bandas intensas em 3610, 1282 e 1068 cm^{-1}, bandas de absorção da deformação axial de CH_3 em 2923 cm^{-1}, deformações axiais dos C=C ligados carbonos dos anéis aromáticos em 1929 cm^{-1}; absorções das deformações C=C do anel em 1511 cm^{-1}, deformações angulares de CH_3 em 1429 cm^{-1}.

Figura 75. Espectro de absorção na região do infravermelho da curcumia (KBr).

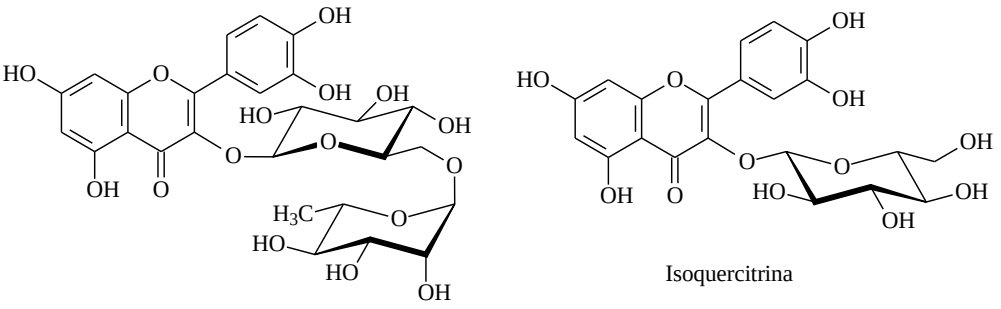


6.2. FLAVONÓIDES DA FAVA D'ANTA

Dimorphandra gardneriana Tul., conhecida como "fava d'anta", é uma árvore leguminosa nativa brasileira, naturalmente encontrada nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará, Pernambuco, Bahia, Pará, Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais. Vagem de "fava d'anta" é uma das fontes para a extração numa escala industrial de rutina e Isoquercitrina (Figura 76).

Principais flavonoides

Figura 76. Representação estrutural da rutina e isoquercitrina.



PREPARAÇÃO DO EXTRATO:

Adicione 20 g de fava d'anta em um cartucho de celulose, coloque em um extrator de soxhlet e submeta a uma extração com Metanol. Após a completa extração, filtre o extrato metanólico utilizando um funil simples e evapore em evaporador rotativo a vácuo ou chapa aquecedora até completa remoção do solvente. Após a secagem o extrato pese e calcule o rendimento.

COLUNA CROMATOGRÁFICA

Submeta as amostras à cromatografia em coluna com 30 g de sílica gel (60-230 mesh), monte a coluna utilizando como eluente acetato de etila. Dissolva cerca de 0,400g do extrato em pequena quantidade de metanol e misture com 1 g de sílica e adicione à coluna. Faça a eluição da coluna com amostra utilizando como fase móvel a seguinte série eluitrópica:

- 100% acetato de etila
- 90% acetato: 10% metanol

- 80% acetato: 20% metanol
- 100% metanol

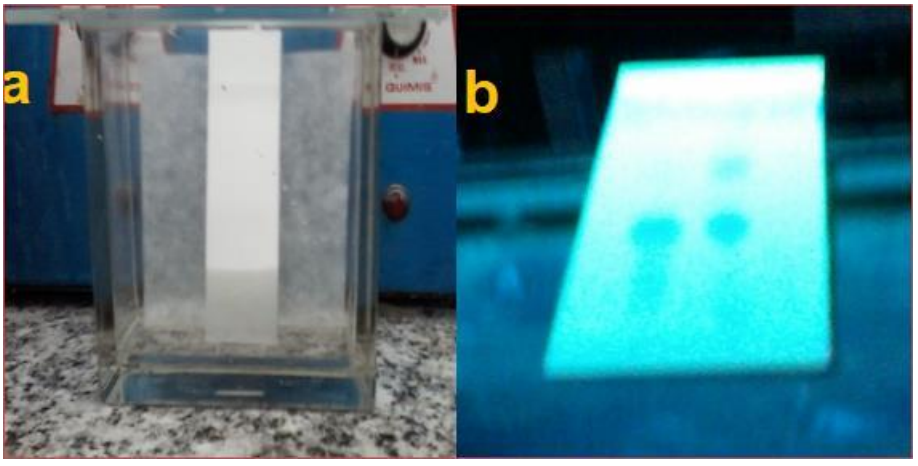
Submeta todas as frações coletadas à CCD com sílica gel 60 F254, utilizando como fase móvel acetato de etila, metiletilcetona, água e ácido fórmico (5:3:1:1). Após a eluição reúna e evapore as frações que apresentarem Rf's similares (Figura 77).

Frações:

18 – 23: Isoquercitrina

24 – 69: Rutina

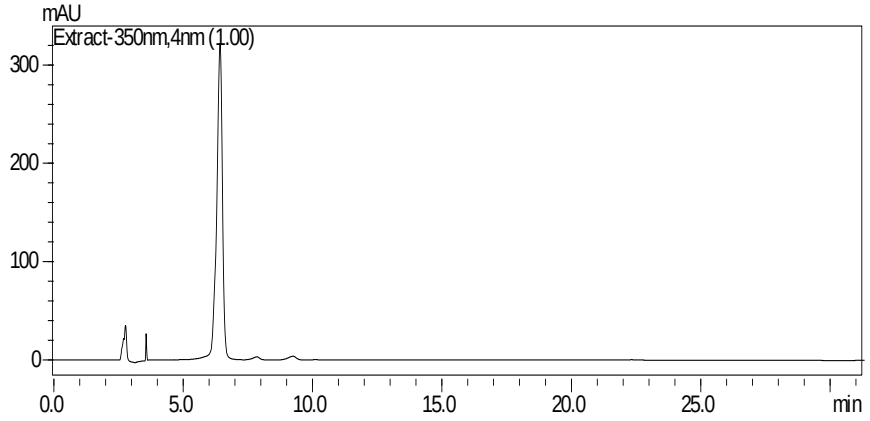
Figura 77. Cromatografia em Camada Delgada do extrato da fava d'anta: a) eluição da cromatoplaca, c) Placa após a eluição revelada com lâmpada de UV em 254 nm.



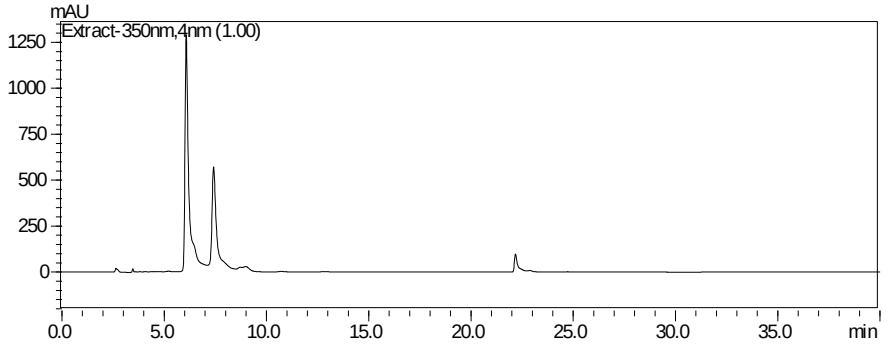
ANÁLISE POR HPLC DO EXTRATO DA FAVA D'ANTA (FIGURA 78)

Fase móvel: 20% acetonitrila e 80% H3PO4 aquoso, em pH= 2,8 (adicionando ácido fosfórico em água); Vazão: 1 ml/min; Comprimento de onda: 350 nm; Temperatura do forno: ambiente; Solubilidade: metanol; Tempo de corrida: 10 minutos; Coluna: Shim-pack CLC (M) – ODS 15 cm com pré-coluna; Pré-coluna: Presente; Bombeamento: Modo Isocrático;

Figura 78. Cromatogramas obtidos por cromatografia liquida de alta eficiência de:



a) Padrão de rutina TR: 6,147 min



b) Mistura de flavonoides da fava d'anta: Rutina, Isoquercitrina e quercetina

07 Testes de atividade antioxidante e quantificação de fenóis e flavonóides de extratos e constituintes de plantas

Nos laboratórios de pesquisa de plantas, testes *in vitro* podem ser efetuados para avaliação do seu potencial biotecnológico. A determinação da atividade antioxidante constitui uma metodologia bastante utilizada no estudo de produtos naturais visando seu aproveitamento.

O interesse nos constituintes antioxidantes da dieta é confirmado pela hipótese oxidativa, causados pelos radicais livres (RL) e que estão envolvidos na iniciação e na progressão de doenças como aterosclerose, câncer e outras associadas aos mecanismos neurodegenerativos (HALIWELL et al., 2007). Embora as espécies químicas reativas, derivadas do oxigênio e do nitrogênio, tenham funções fisiológicas bastante importantes no organismo humano (VASCONCELOS et al, 2007), um mecanismo crítico para o controle da homeostase nas células é a manutenção do seu estado redox, uma vez que o aumento dessas espécies químicas reativas pode desestabilizar o meio biológico.

Várias moléculas são consideradas antioxidantes de importância biológica: ácido ascórbico, vitamina E, compostos fenólicos, ácido lipóico, ubiquinona e outras moléculas endógenas (Diplock *et al.,* 1998). Essas moléculas ingeridas funcionam como redutores biológicos e, assim, podem eliminar os radicais livres ou atuar na modulação gênica, aumentando a defesa antioxidante celular.

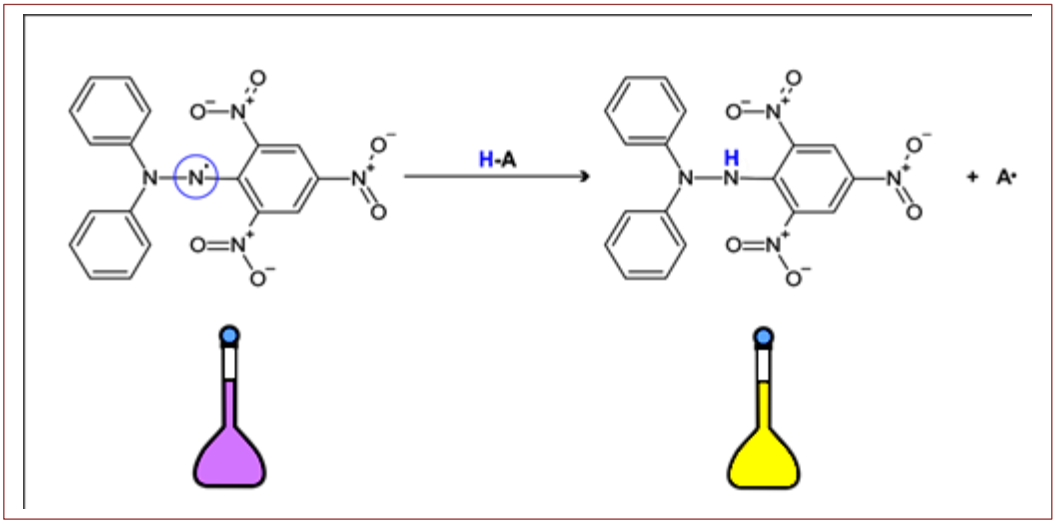
Existem várias técnicas simples e algumas delas foram introduzidas na rotina da prospecção de produtos naturais.

ATIVIDADE SEQÜESTRADORA DO RADICAL LIVRE DPPH

Para determinação do potencial antioxidante será utilizado o método de varredura do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) que é um radical livre que pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável. Devido ao seu elétron ímpar, a solução etanólica do DPPH mostra uma forte banda de

absorção a 515 nm. Radicais DPPH reagem com quantidade adequada de agentes redutores, tornando seus elétrons emparelhados e causando perda estequiométrica da cor da solução com o número de elétrons recebidos (Blois, 1958). Tal reatividade tem sido usada para testar tanto a habilidade dos compostos de agirem como seqüestradores de radicais livres, quanto a atividade antioxidante de extratos de plantas. A redução do radical DPPH pode ser observada pelo decréscimo na absorbância a 515 nm.

Mecanismo da reação entre o radical livre DPPH• e um antioxidante natural através da transferência de um átomo de hidrogênio.



METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-RADICAL LIVRE

Método:

Em um tubo de ensaio, coloque 3,9 ml de uma solução metanólica de radical livre DPPH 6,5.10^{-5} M. Em seguida adicione ao tubo 0,1 mL de solução metanólica da amostra em determinadas concentrações a ser testada. Após 60 min determine a absorbância no espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda 515 nm. A inibição do radical livre DPPH em porcentagem será calculada da seguinte maneira:

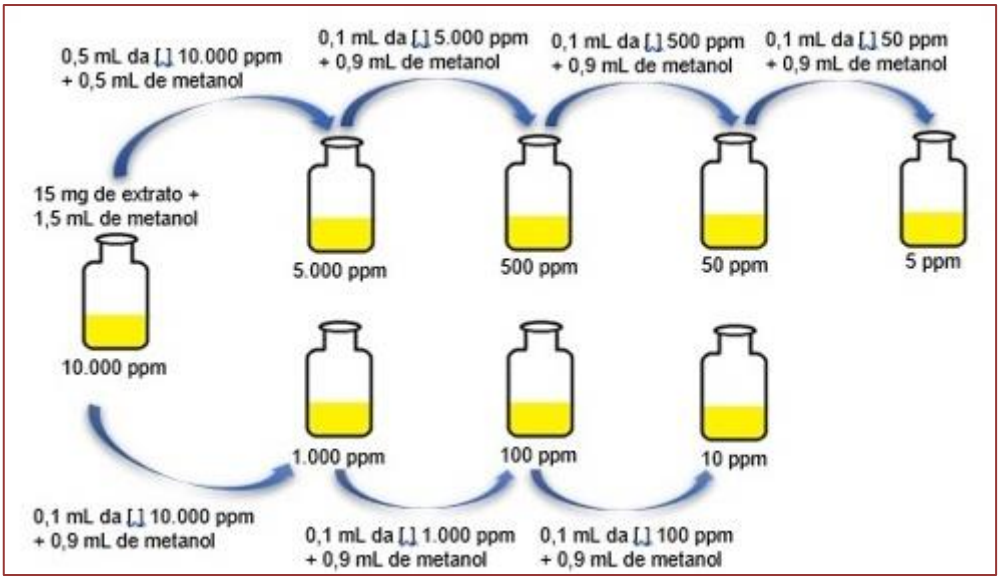
$$IV\% = \frac{Abs(DPPH) - Abs(amostra)}{Abs(DPPH)} \times 100$$

A quantificação da capacidade antioxidante das plantas estudadas foi realizada de acordo com metodologia descrita Yepez *et al.* (2002), com algumas modificações.

Para realização do teste inicialmente prepara-se uma solução metanólica de radical livre DPPH● a 6,5x10^{-5} M pela diluição de 1,3 mg de radical em 50,0 ml de metanol em um balão volumétrico. Em seguida é realizada a leitura e a correção da solução de DPPH● que deverá estar no comprimento de onda entre 0,6 e 0,7 nm.

Logo após é preparada uma solução mãe com concentração de 10.000 ppm, (15 mg do extrato foram solubilizados em 1,5 mL de MeOH). Posteriormente, a solução mãe é diluída nas respectivas concentrações de 5.000, 1.000, 500, 100, 50, 10 e 5 ppm conforme a figura 79.

Figura 79. Esquema de preparação das diversas concentrações da amostra para avalição da atividade antioxidante pelo método do DPPH.



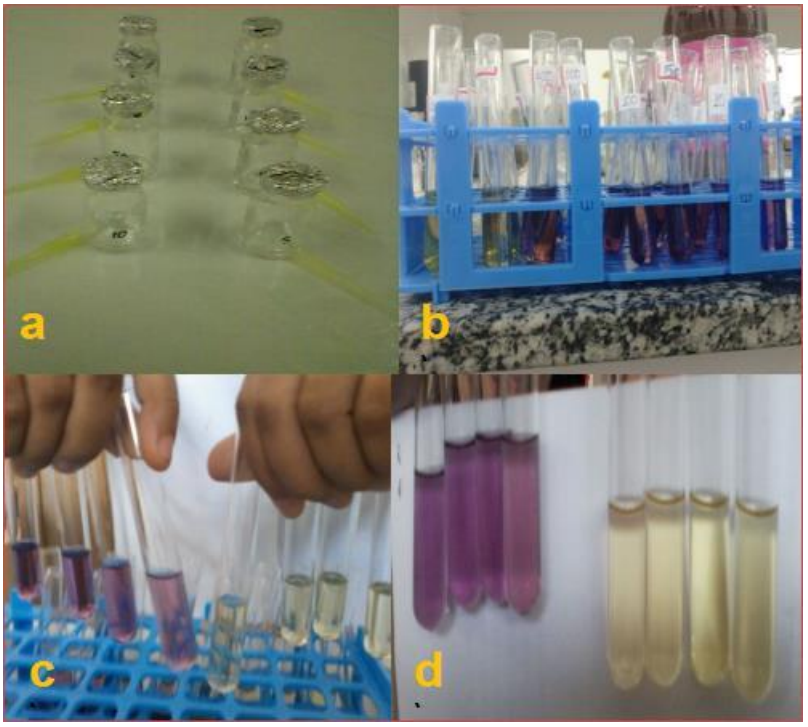
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-RADICAL LIVRE NO EXTRATO DE FAVA DANTA:

Prepare uma solução com concentração de 10000 ppm (10000 mg/L) diluindo 15 mg de extrato da fava d'anta em 1,5 mL de Metanol. Utilizando o esquema acima (Figura 79) realize as diluições sucessivas desta solução para preparar a seguintes concentrações: 5000, 1000, 500, 100, 50, 10 e 5 ppm visualizadas na Figura 80.

Em um tubo de ensaio, coloque 3,9 mL de uma solução metanólica de radical livre DPPH 6,5.10^{-5}M e em seguida adicione ao tubo 0,1 mL de solução metanólica da amostra em determinadas concentrações a serem testadas. Determine depois de 60 min a absorbância no espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda 515nm. A inibição do radical livre DPPH em porcentagem será calculada da seguinte maneira:

$$CI\% = \frac{Abs(DPPH) - Abs(amostra)}{Abs(DPPH)} \times 100$$

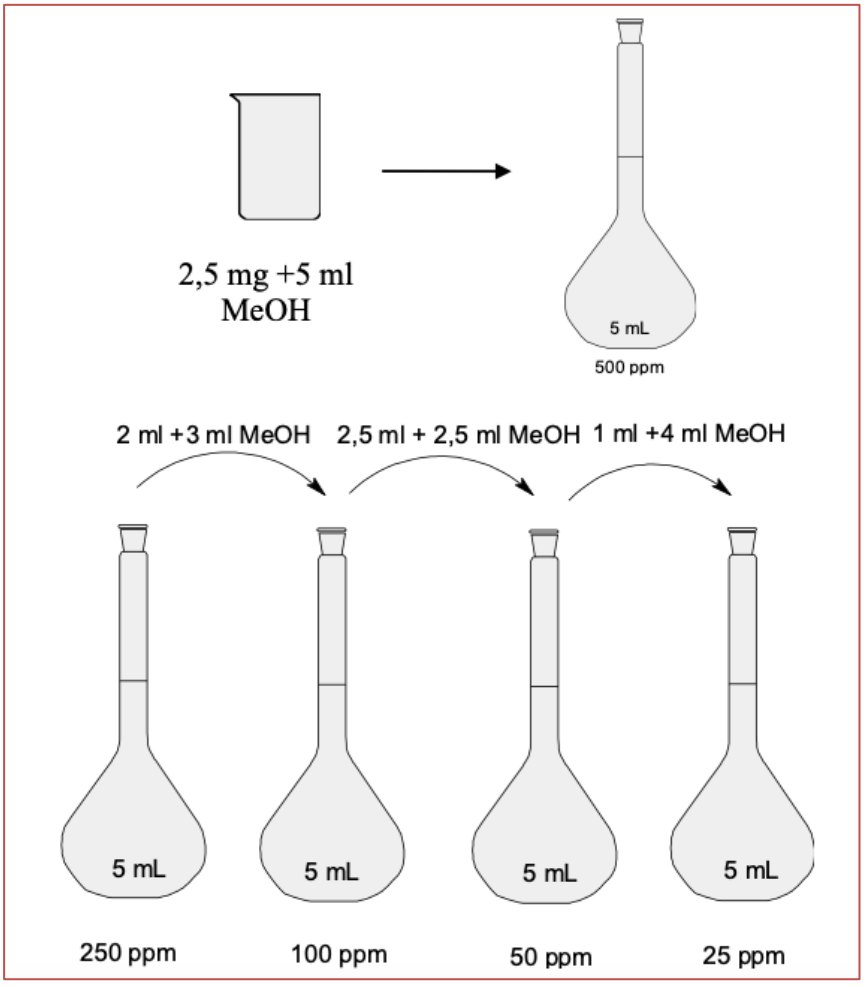
Figura 80. Determinação da atividade anti-radical livre no extrato de fava danta: a) Preparação das soluções 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5 e 1 ppm, b) tubos com 3,9 mL de solução de DPPH 6,5.10^{-5}M e 0,1ml de solução de cada amostra com diferentes concentrações a serem testadas. c) e d) colorações do radical livre (violeta) e do radical inibido (amarelo).



ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO SISTEMA B-CAROTENO ÁCIDO LINOLEICO

É um método de avaliação espectrofotométrico proposto por Marco (1968) e modificado por Miller (1971) que se baseia na perda da cor amarela do β-caroteno (Figura 81), devido à sua reação com radicais que são formados pela oxidação do ácido linoleico em uma emulsão. O ácido linoléico na presença do oxigênio forma o radical peroxil (LOO•), este radical reage com o β-caroteno presente na solução emulsionada, resultando na perda da coloração da solução de cor amarelo intenso para amarelo claro. A avaliação é executada no comprimento de onda a 470 nm, na presença e na ausência de um antioxidante. É um método simples, sensível e de resposta rápida.

Figura 81. Preparo das concentrações da amostra para teste de atividade antioxidante pelo método β-caroteno/ácido linoleico.



Em erlenmeyer ao abrigo de luz prepare uma solução emulsionadada de:

20µL ácido linoléico	Preparação do β-caroteno
200µL tween 40	0,6 mg β-caroteno
2 mL β-caroteno	3 mL clorofórmio
1mL clorofórmio	

Após evaporação do clorofórmio, acrescente 100 mL de água aerada. A solução sistema deverá se encontrar na absorbância entre 0,6 nm e 0,7 nm.

Adicione em tubos de ensaio 5 ml de solução sistema seguidas de 100µL das diluições previamente preparadas. Realize a leitura das amostras no 2º min após o contato das soluções metanólicas em concentração variada com a solução sistema β-caroteno/ácido linoléico. Coloque as amostras em banho Maria a 50º C e passados 120 min faça uma

segunda leitura. A 1ª cubeta deve conter água aerada para a calibração do espectrofotômetro e as demais, as amostras em análise. Como controle 5 ml da solução sistema deve também ser mantida em aquecimento.

CALCULO DO PERCENTUAL % DE PROTEÇÃO ANTIOXIDANTE

$$REDUÇÃO\ DA\ ABSORBÂNCIA = Abs_{inicial} - Abs_{final}\ (Eq.1)$$

$$\%\ OXIDAÇÃO = \frac{[(Redução Abs_{amostra})]}{[Redução\ Abs_{sistema}]} \times 100\ (Eq.2)$$

$$\%\ PROTEÇÃO = 100 - (\%\ oxidação)\ (Eq.3)$$

METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

A determinação do teor de fenóis totais foi feita por meio de espectroscopia na região do visível pelo método de Folin-Ciocalteu (SOUSA et al., 2007). Dissolva 7,5 mg do extrato em metanol, em seguida transfira para um balão volumétrico de 25 mL e complete o volume final com MeOH. Agite uma alíquota de 100 µL dessa solução com 500µL de Folin-Ciocalteu por 30 segundos, em seguida acrescente 6 mL de H_2O destilada e 2mL de Na_2CO_3 à 15%. Agite novamente a mistura por 1min e complete o volume para 10 mL com H_2O destilada (1,4 mL, Figura 82). Em espectrofotômetro UV-Vis determine após 2h a absorbância das amostras em 750 nm utilizando nas cubetas: 1ª cubeta contendo o branco (toda a mistura sem a amostra) e na 2ª cubeta contendo a amostra. A quantificação dos compostos fenólicos será encontrada através de uma curva analítica de ácido gálico.

Figura 82. Preparo das concentrações da amostra para análise do teor de fenóis tota

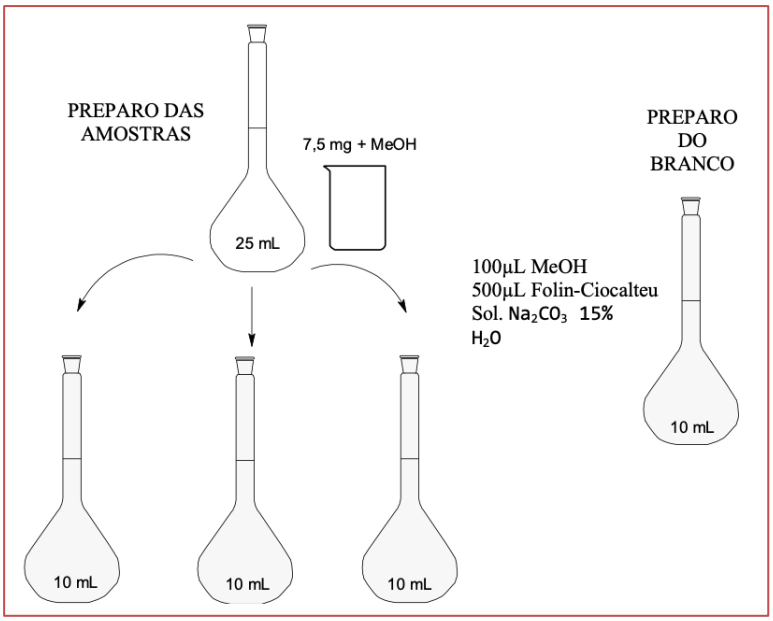
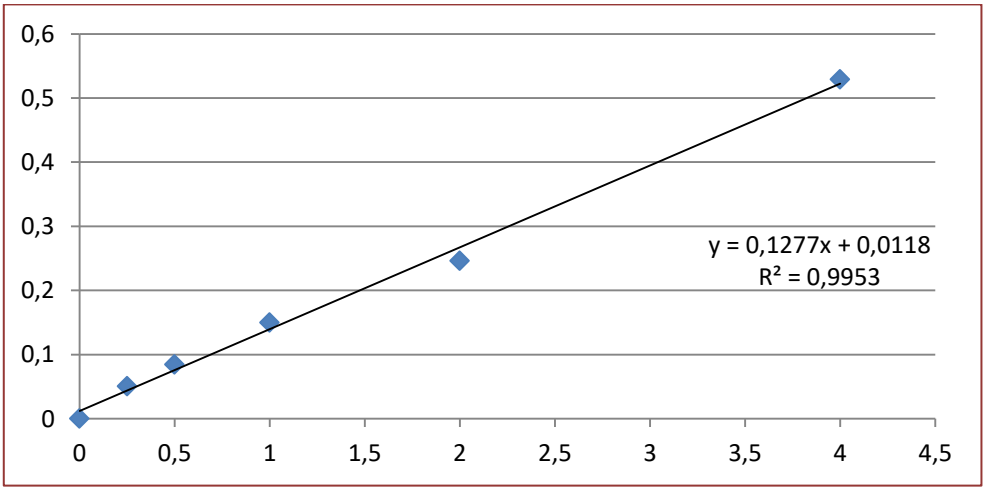


Figura 82a. Absorbâncias das Diversas Concentrações do Ácido Gálico seguida da reta obita no programa Excel (Concentrações X Absorbâncias) para determinação do teor de Fenóis Totais.

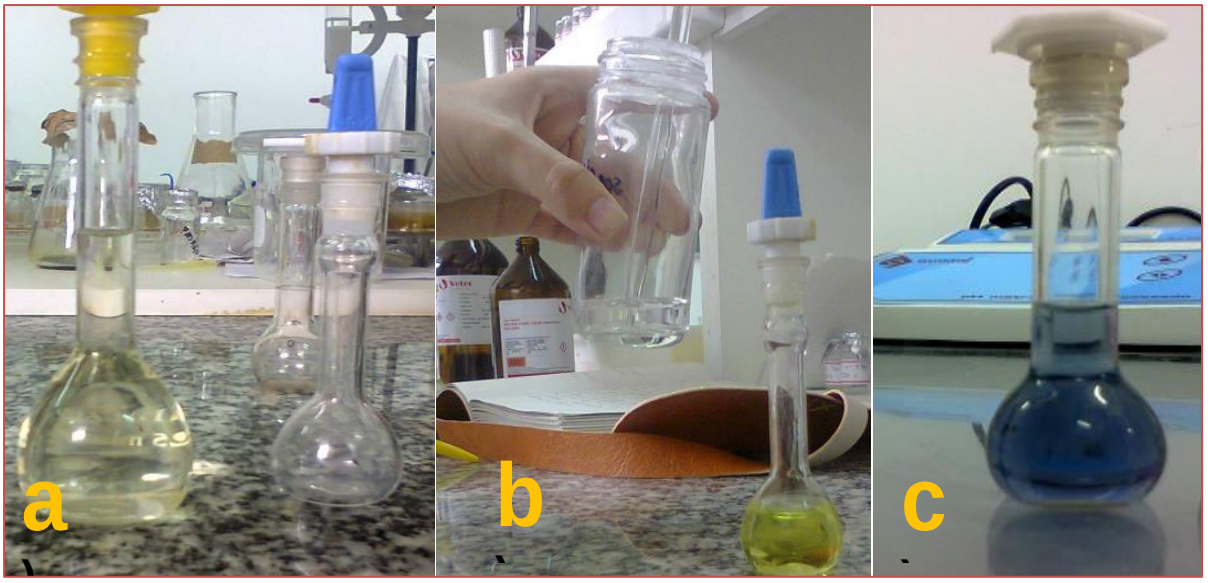
Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs M	[ ] (µg/mL)
0,0000	0,0000	0,0000	**0,0000**	**0,00**
0,0510	0,0600	0,0410	**0,0507**	**0,25**
0,0840	0,0830	0,0870	**0,0847**	**0,50**
0,1420	0,1520	0,1560	**0,1500**	**1,00**
0,2700	0,2080	0,2600	**0,2460**	**2,00**
0,5340	0,5290	0,5240	**0,5290**	**4,00**
0,9940	0,9310	0,9730	**0,9660**	**8,00**



METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PARA O EXTRATO DA FAVA D'ANTA

Pese 7,5 mg do extrato da fava d'ata e dissolva em metanol, em seguida transfira para um balão volumétrico de 25 mL e complete o volume total com metanol. Retire dessa solução uma alíquota de 100 µL e coloque em um balão de 10 mL acrescentando em seguida 500 µL de Folin – Ciocalteu e agite por 30 segundos, depois adicione 6 mL de água destilada e 2 mL de Na_2CO_3 à 15%, agite por mais 1 minuto. Complete o volume do balão com água destilada e mantenha a mistura no escuro por duas horas. Determine em espectrofotômetro a absorbância das amostras a 750 nm. O reativo de Folin-Ciocalteau quando na presença de compostos fenólicos muda sua coloração de amarela para azul e a intensidade da coloração azul é maior quanto maior a quantidade de compostos fenólicos na solução (Figura 83). As análises devem ser realizadas em triplicata. A quantificação dos compostos fenólicos será encontrada através de uma curva analítica de ácido gálico.

Figura 83. Determinação do teor de fenois totais - método de Folin-Ciocalteu no extrato da fava d'anta: a) Extrato diluído, b) Adição do reagente Folin-Ciocalteu, c) Solução pronta para leitura.

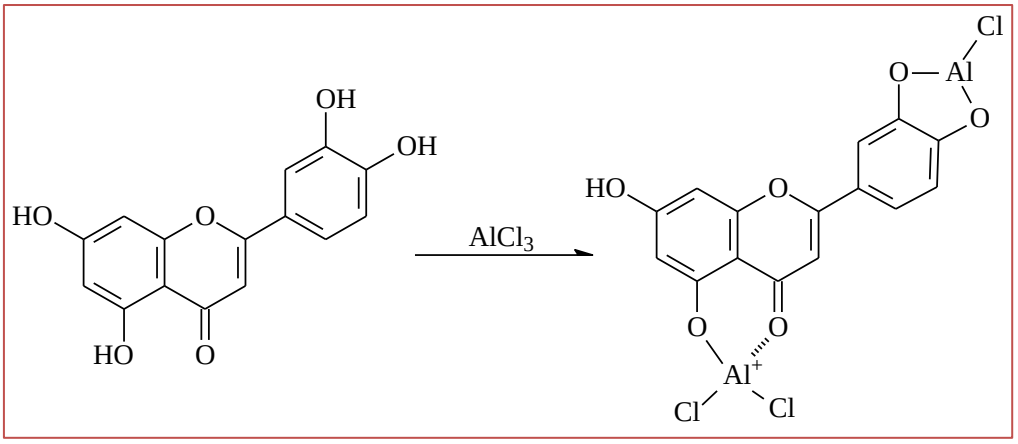


DETERMINAÇÃO DE TEOR DE FLAVONOIDES EM EXTRATOS POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA / VISIVEL

Os flavonóides são compostos sintetizados pelas plantas a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos graxos e outros (Mann,1987). Participantes de importantes funções no crescimento, desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos estando presentes na maioria das plantas se concentrando em partes, tais como: sementes, frutos, casca, raízes, folhas e flores. As principais fontes de flavonóides são os frutos e hortaliças (Dornas, 2007). Os flavonóides apresentam uma estrutura básica constituída por quinze átomos de carbono arranjados em três anéis C_6-C_3-C_6, sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Março et al., 2008).

Os flavonóides estão subdivididos nas principais classes: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, antocianinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonóides, sendo as principais as antocianinas e antocianidinas (Bravo, 1998; Harborne, 1973). A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com sua estrutura, isso se dá particularmente por hidroxilas que doam elétrons estabilizando os radicais livres provenientes do processo de oxidação. Nos flavonóides o determinante estrutural proveniente da ação antioxidante atribui-se as hidroxilas em C4 e C3 que atuariam no aumento do potencial antioxidante (Lien et al., 1999). Na determinação espectrofotométrica de flavonoides em extratos vegetais utiliza-se cloreto de alumínio em solução metanólica. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol. Nessas condições, o complexo flavonóide-A Figura 84 mostra a formação do complexo que absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante.

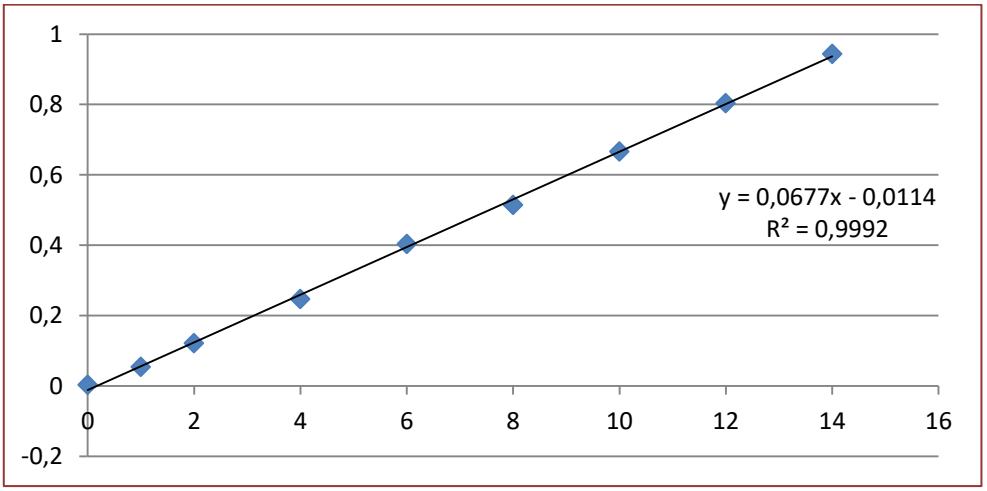
Figura 84. Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (Reproduzido de Markham, 1982)



Preparação do Padrão: Uma curva padrão é preparada tendo como padrão a quercetina (substância de referência) na concentração de 50 µg/mL em etanol. Transfira alíquotas de 2, 3, 4, 5 e 6 mL desta solução para balões volumétricos de 25 mL, contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5% para formação do complexo do flavonóide com $AlCl_3$. Ajuste o volume final de cada balão com etanol e determine a absorbância das soluções a 425 nm. Com os valores das absorbâncias e com as concentrações de cada solução trace um gráfico que após obter sua regressão linear produza uma equação que deve ser utilizada para determinação do teor de flavonoides na amostra.

Figura 85. Absorbâncias das Diversas Concentrações da Quercetina seguida da reta obita no programa Excel (Concentrações X Absorbâncias) para determinação do teor de Flavonoides Totais.

Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs M	[ ] (µg/mL)
0,0050	0,0020	0,0020	**0,0030**	**0,00**
0,0590	0,0520	0,0530	**0,0547**	**1,00**
0,1190	0,1240	0,1210	**0,1213**	**2,00**
0,2440	0,2480	0,2500	**0,2473**	**4,00**
0,4020	0,4000	0,4070	**0,4030**	**6,00**
0,5390	0,4600	0,5430	**0,5140**	**8,00**
0,6740	0,6570	0,6680	**0,6663**	**10,00**
0,8040	0,7990	0,8080	**0,8037**	**12,00**
0,9480	0,9390	0,9440	**0,9437**	**14,00**



Preparação da amostra: Para a quantificação de flavonóides na amostra, prepare uma solução pela dissolução de 60 mg da amostra em 10 mL de etanol. Misture uma alíquota de 2 mL desta solução (concentração de 6 mg/mL) com 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5% e complete o volume em balão volumétrico para 25 mL com etanol. Após 30 min determine a absorbância da amostra a 425 nm, em espectrofotômetro.

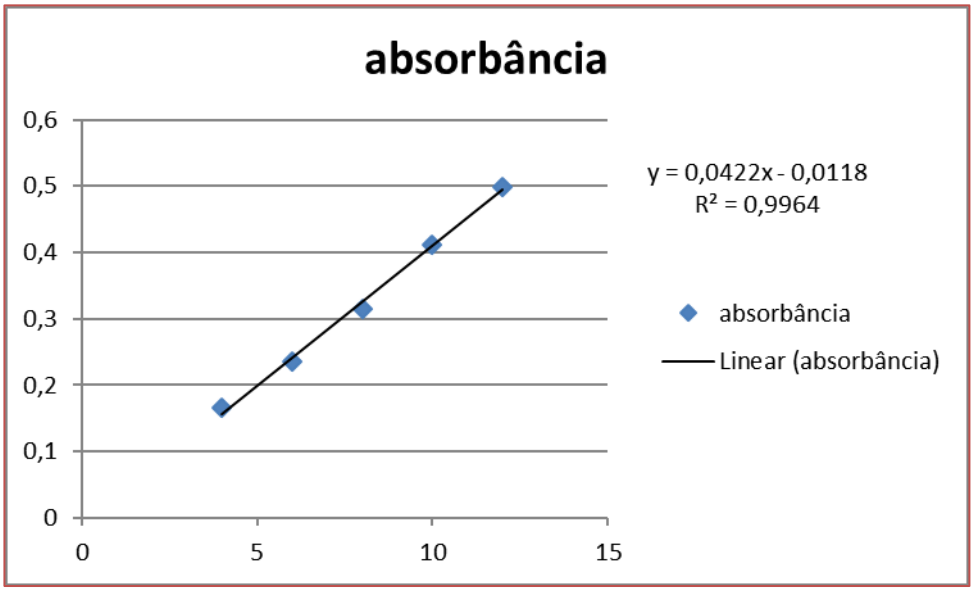
Determinação: Determine as absorbâncias das soluções preparadas com o padrão em triplicata (3 vezes). Monte uma curva de calibração a partir das absorbâncias das soluções padrões e determine a absorbância média da triplicata da amostra. Sabendo a absorbância média da amostra substitua este valor na curva de calibração determine o teor de flavonóides na amostra (tabela 5 e figura 86).

Cálculos: O teor de flavonoides é determinado e o resultado expresso em mg EQ (equivalente de quercetina) por 100g de extrato.

Tabela 5. Curva de calibração obtida com o padrão de quercetina

Concentração do padrão em mg/mL	Absorbância do padrão
4	0,166
6	0,235
8	0,315
10	0,412
12	0,499

Figura 86. Curva de calibração da quercetina obtida a partir da tabela 5 para determinação do teor de flavonoides.



Substituindo o valor da absorbância média na equação obtém-se o teor de flavonóides em µg/mL.

TEOR DE FLAVONÓIDES NO EXTRATO DA FAVA D´ANTA (FIGURA 87)

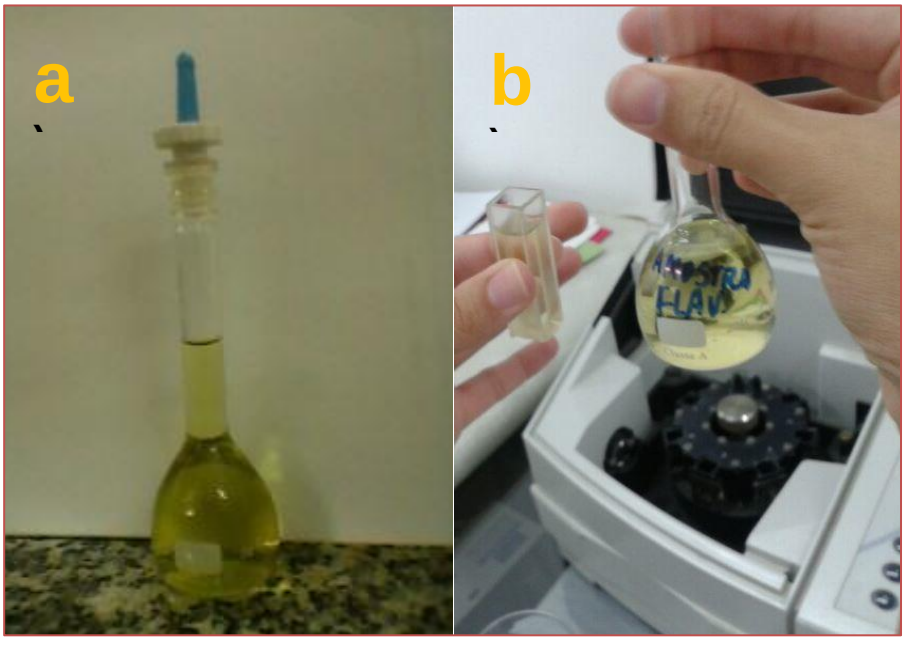
Prepare uma solução mãe, adicionando a um balão de fundo redondo, 20 mg de extrato completando o volume para 10 mL com etanol (70%).

Prepare uma solução de $AlCl_3$ anidro a 2,5% (250 mg em 10 mL de água). Retire 2 mL desta solução e transfira para outro balão de 10 mL. Misture uma alíquota de 2 mL da solução mãe e 1mL do cloreto de alumínio ($AlCl_3$) e complete o volume para 25 mL com etanol. Deixe a solução em repouso por 30 minutos e em seguida, realize a leitura no espectrofotômetro a 425 nm. Realize este teste em triplicata.

Determinação: Determine as absorbâncias das soluções preparadas com o padrão em triplicata (3 vezes). Prepare uma curva de calibração a partir das absorbâncias das soluções padrões de concentração conhecidas e determine a absorbância da média da amostra também em triplicata. Substitua a absorbância média da amostra e calcule, com base na curva de calibração, o teor de flavonóides na amostra.

Cálculos: O teor de flavonides é determinado e o resultado expresso em mg EQ (equivalente de quercetina) por 100 g de extrato.

Figura 87. Teor de Flavonóides no extrato da fava d'anta: a) solução do extrato de fava d'anta em etanol após adição do cloreto de alumínio, b) amostra para leitura.



08 Algumas técnicas de análise estrutural de extratos de produtos naturais

Até recentemente, muitos métodos de fracionamento e purificação de produtos naturais presentes num extrato constituído por centenas de substâncias, além de pouco sensíveis, frequentemente resultavam em substâncias já conhecidas, presentes em várias espécies ou gêneros. Portanto, métodos analíticos avançados capazes de mapear e identificar substâncias bioativas novas em quantidades mínimas de extrato, sem a necessidade de fracionamento e isolamento trabalhosos e custosos, são extremamente importantes desde o início da pesquisa de biodescoberta.

O termo **desreplicação** (derivado do inglês "dereplication") é utilizado pelos químicos de produtos naturais para os processos de identificação rápida de substâncias conhecidas. Estes processos visam maximizar a descoberta de novas moléculas e minimizar a reavaliação de substâncias já reportadas na literatura a partir dos extratos das plantas.

As metodologias de desreplicação incluem a utilização rotineira de técnicas cromatográficas hifenadas, as quais constituem poderosas ferramentas para a análise preliminar de extratos brutos. As que utilizam cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-MS) são as mais comumente utilizadas. Isso porque, dentre as técnicas hifenadas, são as que requerem menor quantidade de amostra para análise, além de menor tempo de análise. Todavia, diversas técnicas de desreplicação e análise de produtos naturais que utilizam a hifenação LC-RMN foram desenvolvidas, apesar de seu alto custo, tanto dos equipamentos para análise como da técnica *per se*. Outras incluem o uso de sistemas multi hifenados, tais como LC-PDA-MS, LC-SPE-RMN, LC-MS/MS, dentre outras.

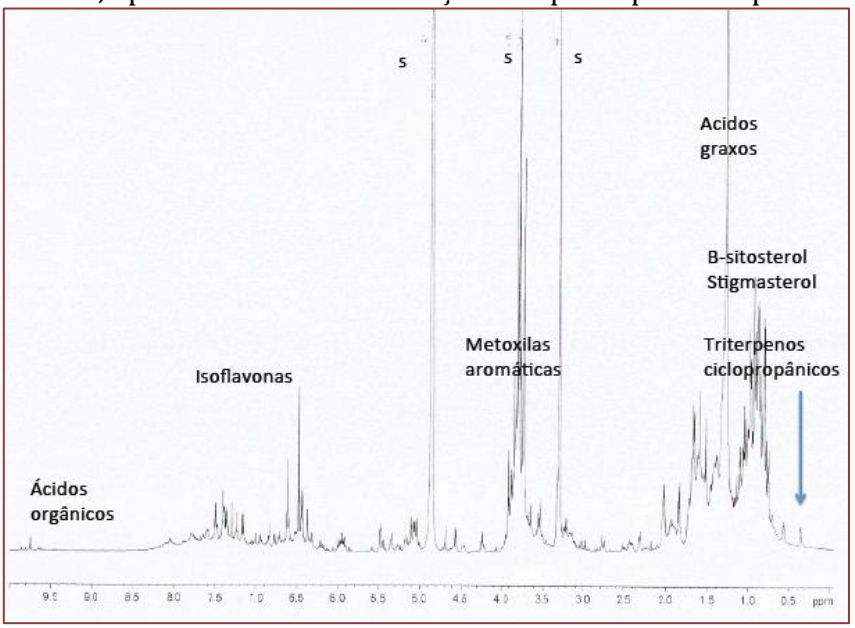
As análises de desreplicação estão atualmente muito bem estabelecidas no âmbito da pesquisa em produtos naturais, devido à sua versatilidade, rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade na análise de extratos brutos, de maneira a prover uma rápida priorização de extratos e substâncias a serem isoladas, evitando-se o re-isolamento de substâncias já conhecidas. Na verdade, atualmente se considera que a desreplicação constitui uma etapa absolutamente essencial na descoberta de produtos naturais bioativos estruturalmente inéditos. Sendo assim, o processo de desreplicação na pesquisa e descoberta de produtos naturais deve ser cada vez mais utilizado e aprimorado.

Hubert, J.; Nuzillard, J.M.; Renault, J.H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? Phytochemistry Reviews, v. 16, p. 55–95, 2017.

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

A figura 88 representa o espectro de RMN^{1}H do extrato metanólico da própolis vermelha, mostrando os principais compostos observados de acordo com os picos correspondentes e baseados nas observações anteriores da composição da própolis vermelha brasileira.

Figura 88. Impressão digital do espectro de RMN^{1}H do extrato metanólico da própolis vermelha, apontando a caracterização dos principais componentes.

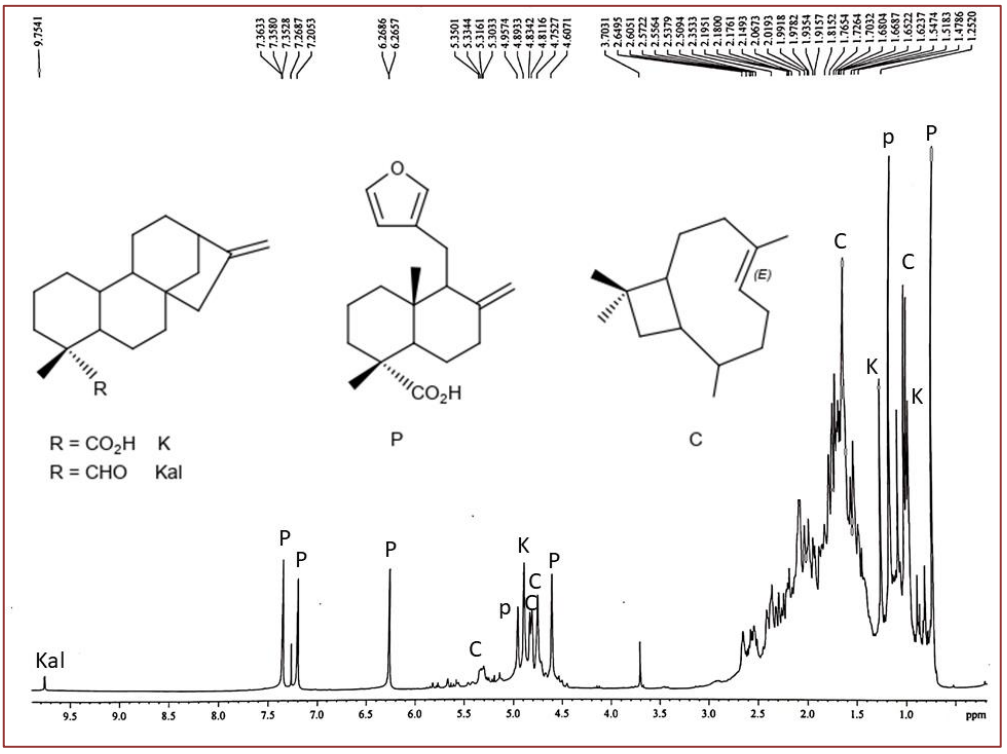


"s"representa solvente

Própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico. Sua composição química é complexa e variada, estando relacionada com a flora de cada região visitada pelas abelhas e com o período de coleta da resina. A composição química da própolis inclui flavonóides (flavonol, isoflavonas, isoflavanas, chalconas, pterocarpanos) sendo muitos metoxilados, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (Lustosa et al, 2008).

Outro exemplo de caracterização de compostos dentro de uma mistura através do espectro de RMNH é a caracterização dos sesquiterpenos do óleo essencial de copaíba mostrado na figura 89 que são caracterizados por determinadas absorções no espectro.

Figura 89. Espectro de RMNH do óleo de Copaíba (Espectro cedido pelo Prof. Edilberto Rocha Silveira da UFC)



Kal = Kaurenal; K = Ácido Kaurenóico; P= Poliáltico; C = Cariofileno

O óleo-resina de copaíba pode ser extraído sustentavelmente a partir do tronco das árvores do gênero *Copaifera.* Este é constituído de sesquiterpenos (óleo essencial) e diterpenos (resina) que apresentam variações no teor mesmo sendo da mesma espécie. O óleo-resina de copaíba possui características aromáticas e atividades farmacológicas

atribuídas aos compostos sesquiterpenos. Estes compostos purificados apresentam aplicação nas indústrias de perfumes, farmacêutica e cosmética. Entretanto, alguns destes compostos ocorrem com mais frequência e apresentam comprovada propriedade medicinal. Dentre eles, o β-cariofileno é o sesquiterpeno mais comum e destaca-se por sua atividade anti-inflamatória. Para o óleo essencial de copaíba também se reporta a atividade antifúngica e antipsoríase. A destilação molecular pode recuperar e purificar sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba com alto grau de pureza (Galúcio et al, 2016).

CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA / ULTRAVIOLETA

Outra técnica que estuda extratos complexos. O "fingerprint" de amostra do Liquido da casca da castanha de caju obtido por CLAE e arranjos de diodo como está mostrado na Figura 90. Cada pico representa um composto que está descrito na tabela correspondente com seu respectivo tempo de retenção (tr) e corresponde ao tempo que permanece na coluna antes de ser detectado. Este depende da polaridade do composto e numa coluna de fase reversa o mais polar tem menor tempo de retenção (Morais et al., 2017).

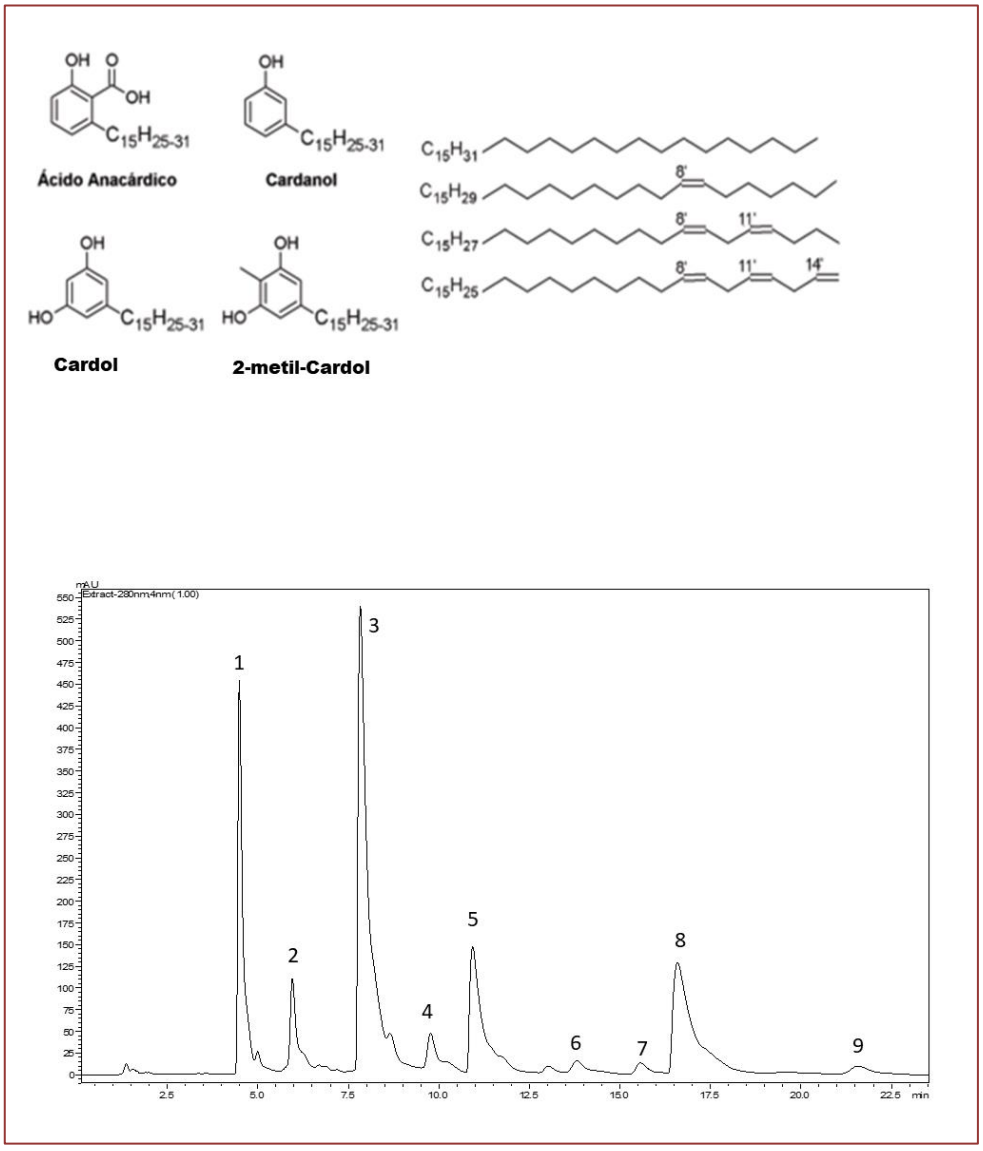
O liquido da castanha de caju natural apresenta principalmente três tipos de compostos cujas estruturas estão mostradas abaixo: ácido anacárdico, cardanol. Este líquido é obtido a partir da casca da castanha de caju por percolação a frio com hexano. Estes são compostos fenólicos com uma cadeia lateral de 15 átomos de carbono e apresentam-se como saturada, mono-insaturada, di-insaturada e tri-insaturada com as duplas sendo não conjugadas e tendo configuração cis.

O líquido da casca da castanha de caju é um produto de pouco valor comercial, mas com alto potencial tecnológico devido à sua constituição fenólica e às suas diversas propriedades biológicas como antimicrobianas, antiinflamatórias, antitumorais, antioxidantes e inseticidas, portanto apresentando ótimas propriedade terapêuticas.

A Figura 90 mostra uma análise do líquido da casca da castanha de caju (LCC). Para obtenção do LCC, as castanhas com cascas foram congeladas e com um auxílio de um descascador apropriado, as cascas foram separadas e imersas em hexano, ficando em maceração por sete dias. Após este tempo o solvente é filtrado e evaporado em rota evaporador, obtendo-se o LCC. A identificação dos constituintes é feita por meio de

análise em Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) equipado com coluna Shim-pack (CLC) ODS GOLD 25 cm, com tempo de corrida de 30 minutos, comprimento de onda do detector de 280 nm e vazão de 1,8 mL/min. A fase móvel foi: 80% acetonitrila e 20% tampão ácido acético a 1%. Nesta figura estão mostradas as estruturas dos constituintes do LCC, o cromatograma da CLAE e uma tabela com os percentuais relativos dos constituintes.

Figura 90. Cromatograma obtido por cromatografia liquida de alta eficiência de do LCC do liquido da castanha de caju natural, obtido a partir da casca da castanha por extração a frio com hexano.

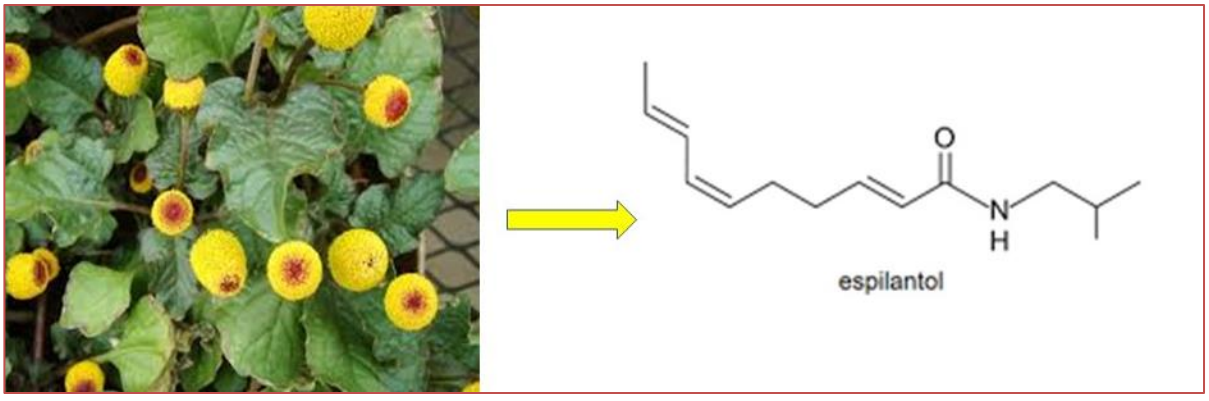


N°	Tempo de Retenção	Descrição	Percentual pela área do pico
1	4.48 min	Cardol trieno	20,49%
2	5.94 min	Cardol dieno	7,89 %
3	7.82 min	Àcido anacárdico trieno	29.73 %
4	9.76 min	Cardol Monoeno	5,06 %
5	10.92 min	Cardanol trieno	11,39%
6	13.81 min	Àcido anacárdico dieno	1,84%
7	15.55 min	Cardanol dieno	0.8 %
8	16.58 min	Àcido anacárdico monoeno	14.04 %
9	21.57 min	Cardanol monoeno	1,83 %

FINGERPRINT DA AMOSTRA DE *SPILANTHES ACMELLA* (L.) MURRAY OBTIDO POR CLAE E ARRANJOS DE DIODO

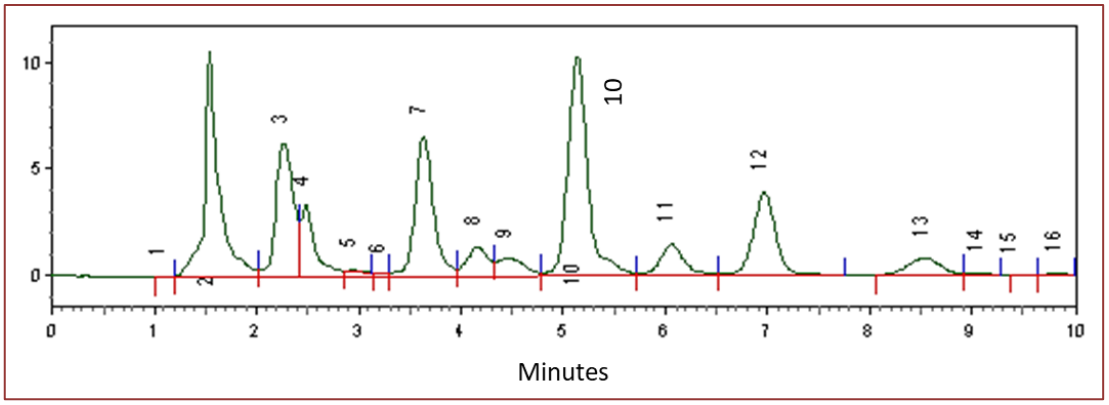
Spilanthes acmella (L.) Murray da família Asteraceae é conhecida no Brasil como jambú (Figura 91). É uma erva típica da região norte do Brasil, onde é utilizada na culinária local em pratos típicos "pato no tucupi" e o "tacacá". O espilantol, (N-isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida), é uma alquilamida alifática de fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$. É o maior constituinte encontrado nas espécies *Spilanthes* e apresenta atividade inseticida contra ovos e larvas de Culex e mosquitos de Aedes.

Figura 90 – Jambu: a) foto de *Spilanthes acmella* (L.) Murray, b) representação da estrutura do Espilantol.



CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS**:** Coluna: Hibar Lichrospher Merck 5 µm, Pré-Coluna: C18 Polymer Aphera 5 µm (1 Cmx 4,6 Mm), Tempo De Corrida: 10 Minutos, Forno: 40 °C, Vazão: 1 mL/minuto, Bombeamento: Isocrático, Comprimento De Onda: 254 Nm, Fase Móvel: 80% Metanol 20 % Água Milli-Q

Figura 91. Cromatogramas obtidos por cromatografia liquida de alta eficiência do extrato das folhas de *Spilanthes acmella* mostrando um pico com tempo de retenção para o espilantol em 5,25 minutos (pico número 10).

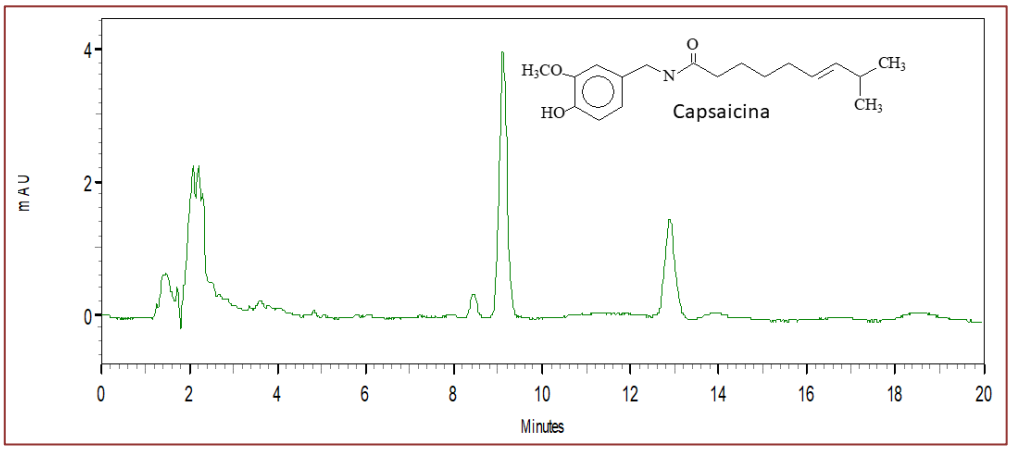


FINGERPRINT DA AMOSTRA DE OLEORESINA DE CAPSICUM – ÓLEORESINA DE PIMENTA A 10%, OBTIDO POR CLAE E ARRANJOS DE DIODO

A óleorresina de pimenta pode ser utilizada na indústria de alimentos como corante ou pela sua característica de pungência que depende da quantidade de capisaicinóides na matéria prima empregada. O cromatograma da oleorresina mostrado na figura 93, apresenta como pico principal em 9,03 minutos a capsaicina.

Condições do Cromatógrafo: Loop de injeção: 20µL, Detector: UV a 280nm, Temperatura: 40ºC, Vazão: 1,5 mL/minuto – isocrático, Coluna: Coluna – Shim-pack CLC ODS (M) 15 cm, Fase Móvel: 65% Acetonitrila-35% Água contendo 1% de Ácido Acético (v/v).

Figura 93. Cromatogramas obtidos por cromatografia liquida de alta eficiência da óleoresina de pimenta 10% mostrando um pico com tempo de retenção para a capsaicina em 9,03 minutos.



NOVAS METODOLOGIAS NO ESTUDO DE PRODUTOS NATURAIS

TÉCNICAS ÔMICAS – TÉNICAS HIFENADAS

Baseados na clássica seqüência de: DNA > transcrição do RNA > PROTEÍNA > METABÓLITOS; na linguagem "oma" tem-se: GENOMA > TRANSCRIPTOMA > PROTEOMA > METABOLOMA.

As tecnologias ômicas (genomica, transcriptomica, proteomica e metabolomica) permitem validar o uso de plantas medicinais mais facilmente e identificar novos compostos naturais e seu mecanismo de ação.

Os estudos metabolômicos são realizados fundamentalmente a partir de análises comparativas sobre os perfis metabólicos individuais obtidos para as diferentes amostras. Um perfil metabólico pode ser definido como um conjunto de sinais cromatográficos e/ou espectroscópicos adquiridos para uma amostra complexa de extratos vegetais, animais e microorganismos, de fluidos biológicos (urina, sangue, plasma, etc.) obtidos a partir de métodos analíticos que revelem todas as características químicas inerentes a determinados padrões funcionais e estruturais das classes de produtos naturais analisadas. Esse conjunto de informações analíticas é interpretado e deve refletir todos os metabólitos secundários detectáveis e presentes na amostra em estudo.

Na verdade, trata-se de análise qualitativa em misturas complexas. As técnicas metabolômicas atualmente disponíveis utilizam plataformas acopladas, sendo, em sua maioria, compostas por um elemento de separação de alta eficiência acoplado a um

detector com capacidade de varredura espectrométrica. Entre as técnicas espectrométricas, a espectrofotometria no ultravioleta-visível com arranjo de diodos (DAD-UV/Vis), a espectrometria de massas de alta resolução (HRMS) e a ressonância magnética nuclear (RMN 1D e 2D) destacam-se para a obtenção de perfis metabólicos de amostras complexas. Detectores DAD - UV/Vis são os mais comumente acoplados a CLAE e ultra-CLAE, pois apresentam alta sensibilidade e boa linearidade (Capriotti et a., 2015).

Nas técnicas hifenadas faz-se uso de técnicas complementares para a identificação dos componentes ativos:

- Combinação entre LC-NMR (cromatografia líquida com detetor de ressonância magnética nuclear),
- LC-DAD (cromatografia líquida com detetor de arranjo de diiodos)
- LC-MS-MS (cromatografia líquida com detetor seletivo de massas tandem)

A química de Produtos Naturais na era pós-genômica continua sendo uma ferramenta fundamental para o entendimento dos mecanismos metabólicos de cada parte da célula e das funções desses metabólitos em determinada unidade celular, mesmo sabendo-se que nenhuma dessas moléculas está envolvida nos processos metabólicos básicos da célula, mas que respondem pela sinalização, adaptação e defesa.

O mais complexo e fascinante no estudo prospectivo de plantas é que cada táxon possui um sistema próprio, caracterizado por metabólitos específicos: alcaloides, terpenóides, fenólicos, etc. Dentro dessa premissa, cerca de 100.000 substâncias de plantas são conhecidas e estima–se que cerca de 4000 novas substâncias são descritas em cada ano.

Os produtos naturais descritos até hoje foram isolados ou registrados a partir de menos de 10% da biodiversidade do mundo, sendo que para os relatos de atividades biológicas e/ou farmacológicas essa parcela é ainda menor. Este fato é em parte resultante do processo de biodescoberta e das estratégias experimentais usadas para este fim, ou seja, de como acessar essas bibliotecas naturais e identificar, numa quantidade enorme de substâncias naturais, aquelas biologicamente ativas de interesse medicinal ou outro qualquer (FUNARI et al, 2013).

CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTUDO INTEGRADO DAS PLANTAS MEDICINAIS PARA A DESCOBERTA DE NOVOS MEDICAMENTOS

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica de extratos e dos constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ALALI, F.Q., LIU; X.X., MCLAUGHLIN; E J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. Journal of Natural Products, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.

[2] ALMEIDA, M.C.S., ALVES, L. A.; SOUZA, L.G.S.; MACHADO, L.L.; MATOS, M.M.; OLIVEIRA, M.C.F.; LEMOS, T.L.G; BRAZ-FILHO, R. Flavonoids e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. Quimica Nova, v. 33, n. 9, p 1877-1881, 2010.

[3] BETTELHEIM, F.A.; LANDESBERG, J.; LEE, J. Laboratory Experiments for General, Organic and Biochemistry. Saunders College Publishing, 1995, 552p.

[4] BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista de Nutrição, Campinas, v.12, n. 2, p. 23-130, 1999.

[5] BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

[6] BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews v.56, p.317-33, 1998.

[7] CAPRIOTTI, A. L., CAVALIERE, C., FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; STAMPACHIACCHIRE, S.; VENTURA, S.; LAGANÀ, A. Ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of free and conjugated natural estrogens in cow milk without deconjugation. Analytical and Bioanalytical Chemistry 407: 1705, 2015.

[8] COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. Química Nova, v.28, n.1, p.149-152, 2005.

[9] COSTA, L.A.M.A.; MORAIS, S.M.; DANTAS, M.C.B.R.D.; LOBO, R.A.C.M.; FONTELES, M.C. Flavonóides com atividade hipotensora de *Alpinia zerumbet* (colônia). Revista Brasileira de Farmácia, v. 79, n. 3/4, p. 96-98, 1998.

[10] COSTA, M.C.C.D. Uso popular e ações farmacológicas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae): revisão dos trabalhos publicados de 1970 a 2003. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v.8, n.2, p.81-88, 2006.

[11] DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach, 2ed. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, 2002, 507 p.

[12] DIPLOCK, A. T., CHARLEUX, J. L., CROZIER-WILLI, G., KOK, F. J., RICE-EVANS, C., ROBERFROID, M. Functional food science and defense against reactive oxidative species. Bristish Journal Nutrition, 80, S77-S112, 1998.

[13] DOERGE, D.; CHANG, H. Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones, *in vitro* and *in vivo*. Journal of Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Science, v. 777, p. 269.

[14] DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES das DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAJEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no extresseoxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

[15] EL GAZZAR, M.; EL MEZAYEN, R.; MARECKI, J.C.; NICOLLS, M.R.; CANASTAR, A.; DRESKIN, E.C. Anti-inflammatory effect of thymoquinone in a mouse model of allergic lung inflammation. International Immunopharmacology, v. 6, n. 7, p. 1135-1142, 2006.

[16] FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: estado da arte, perspectivas e desafios Quimica Nova, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

[17] FURNISS, B.S.; HANNAFORD, A.J.; SMITH, P.W.G. et al. Vogel's Textbook of Pratical Organic Chemistry. Longman Scientific & Technical, London, 1989.

[18] GALI-MUHTASIB, H.; ROESSNER, A.; SCHNEIDER-STOCK, R. Thymoquinone: A promising anti-cancer drug from natural sources. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 38, n. 8, p. 1249-1253, 2006.

[19] GASPARETO, L.; BERGAMO, D.C.B.; BOLZANI, V.S.; KATO, M.J.; AMBRÓSIO, D.L.; CICARELLI, R.M.B. Avaliação da atividade tripanocida de lignanas tetraidrofurânicas de *Peperomia blanda* (Piperaceae). 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005.

[20] GODOY, M.F.P.; VICTOR, S.R.; BELLINI, ADRIANA M.; GUERREIRO, G.; ROCHA, W.C.; BUENO, O.C.; HEBLING, M.J.A.; BACCI JR, M.; SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; PAGNOCCA, F.C. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 16, n. 3, p. 669-672, 2005.

[21] HARBORNE, J. B. em *Phytochemistry*; MILLER, L. P., ed.; Van Nostrand Reinhold Company: New York, 1973, vol. 2.

[22] HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed.; Oxford University Press: Oxford, 2007.

[23] HOBBS, C. A.; KOYANAGI, M.; SWARTZ, C.; DAVIS, J.; KASAMOTO, S.; MARONPOT, R.; RECIO, L.; HAYASHI, S. Comprehensive evaluation of the flavonol anti-oxidants, alpha-glycosyl isoquercitrin and isoquercitrin, for genotoxic potential, Food and Chemical Toxicology, v. 113, p. 218-227, 2018.

[24] HOPP, D.C., ALALI, F.Q., GU, Z., MCLAUGHLIN, J.L. Mono-THF ring annonaceous acetogenins from *Annona squamosa*. Phytochemistry, v. 47, n. 5, p. 803-809, 1998.

[25] IKAN, R. Natural Products, a laboratory guide. 2ed,, Academic Press, Londres, 1991, 360 p.

[26] JUCÁ, M. M., CYSNE FILHO, F. M. S, ALMEIDA, J. C., MESQUITA, D. S., BARRIGA, J. R. M., DIAS, K. C. F., BARBOSA, T. M., VASCONCELOS, L. C., LEAL, L K. A. M., HONÓRIO JÚNIOR, J. E. R., VASCONCELOS, S. M. M. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential, Natural Product Research, 34:5, 692-705, 2020.

[27] LAMEIRA, C. P.; COELHO, G. L. V., MOTHE, C. G. Extração de Lipídeos da amêndoa de Castanha de caju com CO_2 supercrítico. Ciências e Tecnologia de Alimentos. v.17, n.4, p. 405-407, 1997.

[28] LIEN, E. J.; REN, S.; BUI, H. H.; WANG, R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. Free Radical Biol Med. v.26, p.285-294, 1999.

[29] LORENZI, H; ABREU MATOS, F. J. Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas, Ed. Instituto Plantarum, 2002.

[30] LUSTOSA, S.R., GALINDO, A.B., NUNES, L.C.C., RANDAU, K.P., & ROLIM NETO, P.J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.3, p. 447-454, 2008.

[31] MAIA, J.G.S; ZOGHBI, M.G.B; ANDRADE, E.H.A., Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. Coleção Adolpho Ducke, Museu paraense Emílio Goeldi, SUDAM/MCT, Belém, 173 p. 2001.

[32] MANN J. *Secondary metabolism*. Oxford: Clarendon Press; 1987. p.374.

[33] MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 45, p. 594- 598, 1968.

[34] MARÇO, P.H.; POPPI, R.J.; SCARMINIO, I.S. Procedimentos analíticos para identificação da antocianinas presentes em extratos naturais.*Quim. Nova,* v. 31, n. 5, 1218-1223, 2008.

[35] MARKHAM, K R. Techniques of flavonoid identification. Academic Press; London, UK; 113 pp, 1982.

[36] MATOS, F.J.A., Introdução a Fitoquímica Experimental. 3 ed., Edições UFC, Fortaleza, 148 p., 2009.

[37] MATOS, F.J.A., Plantas Medicinais – Guia de Seleção e emprego medicinal de plantas do Nordeste. 3 ed., Edições UFC, Fortaleza, 365 p., 2000.

[38] MENON-MIYAKE, M.A.; SALDIVA, P.H.N.; LORENZI-FILHO, G.; FERREIRA, M.A.; BUTUGAN, O.; OLIVEIRA, R.C. Efeitos da *Luffa operculata* sobre o epitélio do palato de rã: aspectos histológicos. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, v. 71, n. 2, p. 132-138, 2005.

[39] MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 48, p. 91, 1971.

[40] MOGHADAMTOUSI, S.Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H.M.; KADIR, H.A. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. International Journal of Molecular Science, v. 16, p. 15625-15658, 2015.

[41] MORAIS, S.M.; BRAZ-FILHO, R. Produtos Naturais: Estudos químicos e biológicos, EdUECE, 2007, 347p.

[42] MORAIS, S.M., SILVA, K.A., ARAUJO, H., VIEIRA, I.G.P., ALVES, D.R., FONTENELLE, R.O.S., SILVA, A.M.S. Anacardic Acid Constituents from Cashew Nut Shell Liquid: NMR Characterization and the Effect of Unsaturation on Its Biological Activities. *Pharmaceuticals*, v.10, n.1, p. 1-10, 2017.

[43] MORAIS, S.M.; FACUNDO, V.A.; BERTINI, L.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; ANJOS JÚNIOR, J.F.; FERREIRA, S. A. Chemical Composition and Larvicidal Activity of Essential Oils from *Piper* Species. Biochemical Systematics and Ecology, v. 35, n. 10, p. 670–675, 2007.

[44] OLIVEIRA, A. C., VALENTIM, I. B., GOULART, M. O. F., SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H., TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n.3, 689-702, 2009.

[45] OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 17, n. 1, p.36-44, 2015.

[46] RODRIGUES, A.M.; SILVA, A. A. S.; PINTO, C. C. C.; SANTOS, D. L. ; FREITAS, J. C. C. ; MARTINS, V. E. P. ; MORAIS, S. M. . Larvicidal and Enzymatic Inhibition Effects of *Annona muricata* Seed Extract and Main Constituent Annonacin against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Pharmaceuticals, v. 12, p. 112, 2019.

[47] RODRIGUES, P. de A., Selene, S. M., Souza, C. M. de, Silva, A. R. A., Andrade, G. M. de, Silva, M. G. V., Albuquerque, R. L., Rao, V. S., Santos, F. A., Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxibarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from Plectranthus grandis, in ethanol-induced gastric lesions in mice, Journal of Ethnopharmacology, v.127, n. 3, p. 725-730, 2010.

[48] RODRIGUES, P.A.; MORAIS, S.M.; SOUZA, C.M.; SILVA, A.R.A.; ANDRADE, G.M.; SILVA, M.G.V.; ALBUQUERQUE, R.L.; RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Gastroprotective effect of barbatusin and 3-beta-hydroxy-3-deoxibarbatusin, quinonoid diterpenes isolated from *Plectranthus grandis*, in ethanol-induced gastric lesions in mice. Journal of Ethnopharmacology, v. 127, p. 725-730, 2010.

[49] SALUCCI, M; STIVALA, L A; MAIANI, G; BUGIANESI, R; VANNINI, V. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells. British Journal of Câncer, v. 86, n. 10, p. 1645-1651, 2002.

[50] SÁNCHEZ DE MEDINA, F; VERA, B; GÁLVEZ, J; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat, Life Sciences, v. 70, n. 26, p. 3097-3108, 2002.

[51] SILVA, M.G.V.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; ALENCAR, J.W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum*, Fitoterapia, v. 70, (1), p. 32-34, 1999.

[52] SIMÕES, C. M. O., CHENKEL, E. P., GOSMAN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. (Organizadores). Farmacognosia, da planta ao medicamento. Ed. Da UFRGS e da UFSC, 821p., 1999.

[53] SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327, 649-62, 2004.

[54] SOUSA, C. M. M., SILVA, H. R., VIEIRA-JR., G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, C. L. S., ARAÚJO, D. S., CAVALCANTE, L. C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P. B. M., BRANDÃO, M. S., CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

[55] SOUZA, M. A. A. de. Expressão gênica relacionada à produção de óleo essencial e avaliação do metabolismo de *Mentha arvensis* L. sob diferentes condições de cultivo. 2010. 123 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2010.

[56] SOUZA FILHO, A.P.S.; LOBO, L.T.; ARRUDA, M.S.P. Atividade alelopática em folhas de *Tachigali myrmecophyla* (Leg. - Pap.). Planta daninha, v. 23, n. 4, p. 557-564, 2005.

[57] TAHAM, T.; CABRAL, F.; BARROZO, MARCOS. Extração da bixina do urucum utilizando diferentes tecnologias. 16232-16239. 10.5151/chemeng-cobeq2014-1930-16817-141974, 2015.

[58] VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V., BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Química Nova, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

[59] VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; Falcão, M. J. C.; Machado, L. K. A.; BEVILÁQUA, C. M. L.; Costa, I. R. S; Brasil, N.V.G.P.S.; ANDRADE JUNIOR, H.F. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, p. 567-571, 2011.

[60] WAGNER, H.; BLADT, S. In: Plant drug analysis. A thin-layer chromatography atlas, Spinger, Berlin, p. 318, 1996.

[61] YEPEZ, B. et al. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. Fluid Phase Equilibria, [s.l.], v. 194-197, p. 879-884, mar. 2002. Elsevier BV.